

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



**EFFECTO DE LOS REGULADORES DE ÓXIDO NÍTRICO
LA-419 Y ONO-1714
EN UN MODELO-DE INFARTO CEREBRAL FOCAL EN
EL RATÓN.**

Andrea Pozo Rodrigálvarez

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



**EFFECTO DE LOS REGULADORES DE ÓXIDO NÍTRICO
LA-419 Y ONO-1714
EN UN MODELO DE INFARTO CEREBRAL FOCAL EN
EL RATÓN.**

Memoria de tesis para optar al Grado de Doctor:
Andrea Pozo Rodrigálvarez
Madrid, 2014



Memoria presentada por **ANDREA POZO RODRIGÁLVAREZ** para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, en el programa de Doctorado de Neurociencias.

RICARDO MARTÍNEZ MURILLO, Científico titular del CSIC, Doctor en Medicina y Cirugía

ANA PATRICIA FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Doctora en Veterinaria.

AUTORIZAN la presentación de esta Tesis Doctoral titulada: “**EFFECTO DE LOS REGULADORES DE ÓXIDO NÍTRICO LA-419 Y ONO-1714 EN UN MODELO DE INFARTO CEREBRAL FOCAL EN EL RATÓN.**”

Siendo su autora **ANDREA POZO RODRIGÁLVAREZ**, Licenciada en Biología y con el Máster Oficial en Neurociencia, y que ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Instituto Cajal del CSIC, Madrid.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado.

Madrid, a 9 de Julio de 2014

VºBº Director

VºBº Directora

Dr. Ricardo Martínez Murillo

Dra. Ana Patricia Fernández Fernández

“Sin Ciencia no hay Futuro”

Cuadro que ilustra la portada y contraportada: **“Homenaje al Profesor Salvador Moncada que supo identificar al factor de relajación endotelial (EDRF) como el Oxido Nítrico (NO).”** del Prof. José Rodrigo García.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por la financiación de la Red RENEVAS y de los Laboratorios LÁCER S.A. (2010-2012) y MICINN (SAF 2010-15173)

A mi hermano y mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo la oportunidad que me dieron, hace ya unos años, **Ricardo Martínez** y **Patricia Fernández**, cuando me confirmaron que podía empezar en su laboratorio este proyecto que acaba hoy aquí. Ha sido un placer trabajar con vosotros. No tengo palabras para expresar la gratitud por todo lo que me habéis enseñado, tanto a nivel profesional como a nivel personal.

A la gente del laboratorio. A los que están: **Julia**, muchas gracias por tus sugerencias, tu interés y ¡por todo!; **Isidro** ¡es imposible ser más eficiente! A los que estuvieron: **J. Rodrigo**, gracias por dejarme usar uno de tus maravillosos cuadros para ilustrar la portada, ¡es todo un honor! **Bea**, fue increíble trabajar contigo ¡Te echo de menos! Y a tod@s aquell@s que pasaron, porque cada un@ de ell@s me enseñó algo.

A **Marisabel Mourelles**, **Ana Gradillas** y **Javier Pérez** por confiar en mí y dejarme trabajar con sus compuestos.

A las personas que han colaborado en esta Tesis. A **José Joaquín** de la UCM, gracias por tu disposición y por tu ayuda. Al grupo de Resonancia Magnética de la UCM (**Mariem**, **David** y **Palmira**) porque prácticamente todo empezó allí.

A tres personas que han sido esenciales durante esta etapa. **Sol**, muchas gracias por ayudarme, por nuestras largas charlas, por nuestras caminatas y por estar siempre ahí ¡eres increíble y te mereces todo lo bueno del mundo! A **María**, te conocí a mitad de camino, pero quiero que sepas que eres muy importante para mí, muchas gracias por tus consejos a todos los niveles y ¡por esas comidas tardías! Y como no... a mi pequeña **Raquel**, ¡eres simplemente genial!! Gracias por tu apoyo en todo momento, mucha parte de este trabajo te la debo a ti, gracias por esas tardes locas, por esos momentos serios, porque empezaste como compañera pero has acabado como amiga.

A todas las personas del Cajal porque de una u otra manera tod@s formáis parte de esto. A los vecinos del **A-21** (**Juan de Carlos**, **Marieta**, **Mariam**, **Yoli**, **Nieves**) y como no **Raúl**, gracias por las risas y porque siempre tenías una palabra bonita que decir y, a **María Pedraza** ¡ir a la UAM sin ti no es lo mismo! A **Carmen** del **A-01**, por nuestras fotos, ¡qué momentos! A **Julián** del **MA-01**, porque tu optimismo se contagia. Al **B05** (**Nacho Torres**, **Lola**, **Miguel**, **Edwin**, **Ángel**), mi casi segundo laboratorio, siempre era un placer entrar allí, a **Laura**, que nos conocimos entre isquemias; a **Andrea**, gracias por aquellos ratones y por hacer que cada llamada de nombre fuera emocionante; a **Víctor**, por ser tan buena gente y por las partidas de ping-pong, queda la revancha, ¿eh?. Al **B-01** (**Irene**, **Noelia**, **Chema**), y **Óscar**, porque hablamos el mismo idioma (tú que pensarías si te digo..."¿puedes coger ese ratón por la cola?"). Al **B-21** (**Asun**, **Lorenzo**, **Natalia**) y a **Elena** del **B-16** porque sois de esas personas que sabes que te van a caer bien nada más verlas (y no me equivoqué). Al **C-05** (**Carmen Guaza**, **Miriam**, **Fran**, **Ana**) porque os admiro y espero que la Asociación ConCiencia siga teniendo tanto éxito. Al **C-21** (**Pilar Sánchez**, **Gabi**, **Concha**, **Elsa**, **Isidoro**), la otra

mitad de mi otro casi segundo labo, gracias por vuestra ayuda y vuestras sonrisas. Al **C-15** (Eva, Eva, Çağla Vanesa) porque sois unos amores. Al **MB03** (Simona), **Paloma**, gracias por hacer más amenos esos ratos en el quirófano. A **Carmen**, de la limpieza, porque la jornada empezaba con sus "Buenos días" y, a **Aurelio**, de recepción, porque acababa con su "Hasta mañana, ve con cuidado". A **Óscar Herreras, María de Ceballos, Ruth y Aixà, Washington Buño, Adolfo Toledano**...A la gente del **Animalario** (Laude, Lorena, Emi, Mario, Cheli, Miriam y Maritza) por todas las horas que hemos compartido. A la gente de **Administración** (Ana, Jose, Yago y Félix), **Almacén, M. Electrónico, Mantenimiento, Cultivos celulares, SBMC, Confocal, Biblioteca, Citometría, Informática** y, a todos aquell@s que se me ha olvidado poner, es que...¡¡¡sois muchos!!!

Por supuesto, a los que me picaron con esto de la ciencia, mis amig@s, **Nuri, Carol y David**. A vosotros debo esto y a vosotros os la dedico también, cómo hemos evolucionado desde que nos conocimos en aquel labo del Hospital Ramón y Cajal...

A mis amigas, que son como mis hermanas, **Luci, Vero, Lau, Cris, Cris, Clau, Ire, Jose, Bea**...porque estaremos cada una en una punta del mundo, pero ¡sois las mejores amigas que se puede tener! A **José y Toñi**, gracias por vuestra preocupación y ayuda.

Por supuesto, a mi familia. A **mis padres**, gracias porque sois mi apoyo en todo momento, sois mi modelo a seguir y, algún día, espero poder llegar a ser la mitad de lo que sois. A mi **hermano**, gracias por ser como eres, porque no he conocido a nadie más valiente y valioso, más inteligente y alegre, más responsable y razonable que tú. ¡Os quiero mucho!

A **Ricardo**, gracias por tu paciencia y por esperarme, ya queda nada...Gracias por ponérmelo todo tan fácil, y por hacerme tan feliz.

A **Gordo y Gorda**, porque me habéis enseñado mucho y me habéis hecho pensar más. A mi **portátil**, por aguantar como un campeón. Y como no, a todos los **ratones** que sin quererlo dieron la vida por este trabajo.

Y paro porque esta etapa ha sido tan bonita y tan espectacular que si sigo escribiendo se me van a escapar las lagrimillas por el recuerdo y la emoción....

¡Chin-Pum!

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AG	Aminoguanidina
AIT	Accidente Isquémico Transitorio
Akt	Protein quinasa B
AMPA	Receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATP	Adenosín trifosfato
Bax	Proteína pro-apoptótica (<i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica (<i>B-cell lymphoma 2</i>)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>)
BH₄	Tetrahidrobiopterina
BHE	Barrera Hematoencefálica
Bid	Proteína proapoptótica de la familia Bcl-2
BrdU	Bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina)
$^{\circ}\text{Ca}^{2+}$	Ión Calcio
Ca^{2+}_i	Ión Calcio intracelular
CDA	Coeficiente de Difusión Aparente
Cl⁻	Ión Cloro
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DCX	Doblecortina (<i>Doublecortin</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECV	Enfermedad cerebrovascular
EDRF	Factor de relajación derivado del endotelio (<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)
EEG	Electroencefalografía
EGF	Factor de crecimiento endotelial (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial (<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
FMN	Flavín Mononucleótido

FSC	Flujo Sanguíneo Cerebral
GABA	Ácido Gamma-AminoButírico (<i>Gamma Aminobutyric Acid</i>)
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
GMPc	Guanosinmonofosfato cíclico
GTPc	Guanosintrifosfato cíclico
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (<i>High Density Lipoproteins</i>)
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1 (<i>Hypoxia Inducible Factor</i>)
HR-MAS	Espectroscopía de alta resolución en rotación de ángulo mágico (<i>High Resolution -Magic Angle Spinning</i>)
Hsp90	Proteína de choque térmico 90 (<i>Heat shock protein 90</i>)
HTA	Hipertensión arterial
Iba1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado tipo 1 (<i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>)
IL-1	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
INE	Instituto Nacional de Estadística
INF-γ	Interferón-gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
K⁺	Ión Potasio
Ki	Coeficiente de inhibición
Ki67	Marcador de proliferación celular
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>Low Density Lipoproteins</i>)
L-NMMA	L-NG-monometil arginina
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LSR	Lausanne Stroke Registry
MCA	Arteria cerebral media (<i>Middle Cerebral Artery</i>)
Mg²⁺	Ión Magnesio
mmHg	Milímetros de Mercurio
MMP2	Metaloproteinasa de Matriz 2
MMP9	Metaloproteinasa de Matriz 9
Na⁺	Ión Sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida
NFκ-β	Factor nuclear κβ (<i>Nuclear Factor κβ</i>)
NG2	Proteoglicano condroitín sulfato (<i>Chondroitin Sulfate Proteoglycan</i>)

NINCDS	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal (<i>neuronal Nitric Oxide Synthase</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintasa (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
O₂⁻	Anión superóxido
·OH	Radical Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO⁻	Peroxinitrito
PA	Presión Arterial
PAD	Presión Arterial Diastólica
PAS	Presión Arterial Sistólica
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Quinasa
PKA	Proteín Quinasa A
PKC	Proteín Quinasa C
pMCAO	Oclusión permanente de la Arteria Cerebral Media (<i>permanent Middle Cerebral Artery Occlusion</i>)
RLO	Radical Libre de Oxígeno
r-tPA	Activador Tisular de Plasminógeno Recombinante (<i>recombinant tissue Plasminogen Activator</i>)
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (<i>quantitative Real Time PCR</i>)
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD-1	Superóxido dismutasa 1
SRB	Sulforrodamina-B
TCA	Ácido tricloroacético (<i>Trichloroacetic Acid</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α (<i>Tumoral Necrosis Factor α</i>)
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Registry
TPF	1,3,5-trifenilformazán (<i>1,3,5-triphenylformazan</i>)
TTC	2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (<i>2,3,5-triphenyltetrazolium chloride</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
ZSG	Zona subgranular del giro dentado de hipocampo
ZSV	Zona subventricular de los ventrículos laterales

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR	3
1.1.1. Definición y Epidemiología	3
1.1.2. Factores de Riesgo	4
1.1.3. Clasificación	7
1.1.4. Tratamiento	9
1.1.5. Fisiopatología	10
1.1.5.1. Cascada Isquémica	13
1.1.5.1.1. Componente Neuronal	14
1.1.5.1.2. Componente Glial	16
1.1.5.1.3. Componente Vascular	17
1.1.5.2. Cascada Inflamatoria	19
1.1.5.3. Cascada Apoptótica	21
1.1.6. Neurorreparación y Angiogénesis tras la Isquemia	23
1.2. ÓXIDO NÍTRICO	25
1.2.1. Síntesis. Óxido Nítrico Sintetasas	26
1.2.2. Óxido Nítrico en la Isquemia Cerebral	32
1.2.3. Regulación de los Niveles de NO como Tratamiento de la Isquemia Cerebral	38
1.3. LA-419 y ONO-1714	42
1.3.1. LA-419	42
1.3.2. ONO-1714	43
1.4. MODELOS EXPERIMENTALES <i>in vivo</i>	44

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.1 MODELO EXPERIMENTAL	57
3.2. LA-419	58
3.2.1 Grupos experimentales	58
3.2.2. Preparación y administración del compuesto LA-419	59
3.2.3. Medición de los Volúmenes de Infarto	60
3.2.3.1. Tinción histológica TTC	60
3.2.3.2. Imagen por Resonancia Magnética	61
3.2.4. HR-MAS	62
3.2.5. Estudio Inmunohistoquímico	62
3.2.5.1. Fijación de los tejidos	62
3.2.5.2. Inmunohistoquímica	63
3.2.6. Western blot	65
3.2.7. qRT-PCR	67
3.2.8. Ensayos de actividad enzimática	68
3.2.8.1. Estimación SOD-1	68
3.2.8.2. Ensayo Caspasa-3	68
3.2.9. Test coordinación motora “Tightrope”	69
3.2.10. Expresión de los resultados y análisis estadístico	69
3.3. ONO-1714	70
3.3.1. Ensayos detección iNOS <i>in vitro</i>	70
3.3.1.1. Determinación de la viabilidad celular	71
3.3.2. Administración ONO-1714 <i>in vivo</i>	71
3.3.3. Expresión de los resultados y análisis estadístico	72

4.RESULTADOS	73
4.1. LA-419	75
4.1.1. OBJETIVO 1: Comprobar si existe reducción del volumen de infarto y en qué tiempo es mayor esa reducción por la administración de LA-419, tras pMCAO en el ratón.	75
4.1.2. OBJETIVO 2: Estudiar la vía de actuación de LA-419 para la regulación del sistema NOS.	78
4.1.3. OBJETIVO 3: Analizar los cambios de expresión de distintos marcadores de las cascadas isquémica, inflamatoria y apoptótica.	83
4.1.3.1. Cascada isquémica	83
4.1.3.2. Cascada inflamatoria	84
4.1.3.3. Cascada apoptótica	88
4.1.4. OBJETIVO 4: Estudiar el efecto del tratamiento con LA-419 sobre la reacción glial y la neuroreparación tras la pMCAO.	90
4.1.5. OBJETIVO 5: Estudiar la coordinación motora de los ratones isquémicos tratados con LA-419 y analizar su evolución temporal.	95
4.2. ONO-1714	96
4.2.1. OBJETIVO 6: Comprobar si ONO-1714 es capaz de inhibir los efectos de iNOS <i>in vitro</i> y si su administración afecta a la viabilidad celular.	96
4.2.2. OBJETIVO 7: Analizar si la administración crónica de ONO-1714 es capaz de reducir el volumen de infarto tras la pMCAO en el ratón.	98

5. DISCUSIÓN	99
5.1. LA-419	101
5.1.1. OBJETIVO 1: Comprobar si existe reducción del volumen de infarto y en qué tiempo es mayor esa reducción por la administración de LA-419, tras pMCAO en el ratón.	102
5.1.2. OBJETIVO 2: Estudiar la vía de actuación de LA-419 para la regulación del sistema NOS.	103
5.1.3. OBJETIVO 3: Analizar los cambios de expresión de distintos marcadores de las cascadas isquémica, inflamatoria y apoptótica.	105
5.1.4. OBJETIVO 4: Estudiar el efecto del tratamiento con LA-419 sobre la reacción glial y la neurorreparación tras la pMCAO.	108
5.1.5. OBJETIVO 5: Estudiar la coordinación motora de los ratones isquémicos tratados con LA-419 y analizar su evolución temporal.	109
5.2. ONO-1714	111
5.2.1. OBJETIVO 6: Comprobar si ONO-1714 es capaz de inhibir los efectos de iNOS <i>in vitro</i> y si su administración afecta a la viabilidad celular.	112
5.2.2. OBJETIVO 7: Analizar si la administración crónica de ONO-1714 es capaz de reducir el volumen de infarto tras la pMCAO en el ratón.	112
6. CONCLUSIONES	115
7. RESUMEN	119
8. BIBLIOGRAFÍA	123
9. ANEXO	151

ÍNDICE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Factores de Riesgo ECV	4
Figura 1.1. Clasificación ECV	7
Figura 1.2. Anatomía MCA	9
Figura 1.3. Núcleo y penumbra isquémicos	12
Figura 1.4. Progresión lesión isquémica	13
Figura 1.5. Cascada isquémica	13
Figura 1.6. Resumen temporal cascada isquémica	23
Figura 1.7. Áreas funcionales del cerebro	25
Figura 1.8. Síntesis NO	27
Figura 1.9. Estructura NOS	28
Tabla 1.2. Características NOS	32
Figura 1.10. Activación eNOS	34
Figura 1.11. Funciones NO	38
Figura 1.12. Estructura ONO-1714	43
Tabla 1.3. Clasificación modelos MCAO	45
Tabla 1.4. Recomendación modelos MCAO	45

3.MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1. Procedimiento quirúrgico pMCAO	57
Esquema 3.1. Recorrido temporal estudio	58
Tabla 3.1. Anticuerpos primarios inmunohistoquímica	64
Tabla 3.2. Anticuerpos secundarios inmunohistoquímica	65
Tabla 3.3. Anticuerpos primarios western blot	66
Tabla 3.4. Anticuerpos secundarios western blot	66
Tabla 3.5. Primers qRT-PCR	67

4.RESULTADOS

LA-419

Figura 4.1. Tinción TTC	76
Figura 4.2. Coordinación motora	76
Figura 4.3. Resonancia magnética	77
Figura 4.4. qRT-PCR NOS	79
Figura 4.5. Inmunohistoquímica y western blot: nNOS	80
Figura 4.6. Inmunohistoquímica y western blot: iNOS	81
Figura 4.7. Western blot: Akt y Hsp90	82
Figura 4.8. HRMAS	83
Figura 4.9. Actividad SOD-1	84
Figura 4.10. Inmunohistoquímica y western blot: MMP9	85
Figura 4.11. Inmunohistoquímica: COX-2	86
Figura 4.12. Marcaje Lectina de Tomate	87
Figura 4.13. Inmunohistoquímica: Colágeno IV	87
Figura 4.14. Actividad Caspasa-3	88
Figura 4.15. Inmunohistoquímica: Bax	89
Figura 4.16. Inmunohistoquímica y western blot: GFAP	91
Figura 4.17. Inmunohistoquímica: NG2	92
Figura 4.18. Inmunohistoquímica: DCX	93
Figura 4.19. Inmunohistoquímica: BrdU y Ki67	94
Figura 4.20. Evolución coordinación motora	95

ONO-1714

Figura 4.21. Inhibición y supervivencia <i>in vitro</i>	97
Figura 4.22. TTC	98

5.DISCUSIÓN

Figura 5.1. Resumen LA-419	110
----------------------------	-----

1.INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

1.1.1. Definición y Epidemiología

La enfermedad cerebrovascular (ECV) comprende cualquier trastorno transitorio o permanente derivado de la oclusión o rotura de uno o más vasos sanguíneos que irrigan el encéfalo afectando la funcionalidad de una o varias partes del mismo (Díez-Tejedor et al., 2001).

Hipócrates (460-377 a.C.) ya reconoció esta patología a la que denominó apoplejía y que incluyó en algunos de sus aforismos: *“La apoplejía fulminante es imposible de curar; y aun, en verdad, no es fácil de curar la menos intensa. De los cuarenta a los sesenta años es cuando están los individuos más expuestos a la apoplejía”*. Este concepto también se conoce con el término latino *Ictus* o el anglosajón *Stroke*, que significan “golpe”, representando el carácter súbito y brusco del proceso. Otros sinónimos son ataque cerebral o accidente cerebrovascular, derrame cerebral e infarto cerebral (Díez-Tejedor et al., 2001).

El ictus representa la tercera causa de muerte en el mundo occidental después de la enfermedad coronaria y el cáncer, además de la primera causa de discapacidad física en las personas adultas y la segunda de demencia según datos recogidos en 2003 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Organización Mundial de la Salud, 2003; Lin, 2013). Cada año, 15 millones de personas en el mundo sufren un ictus, de las cuales 5 millones mueren (lo que equivale al 32% de muertes producidas por enfermedades cardiovasculares a nivel global, según datos del 2002) y otros 5 millones sufren una discapacidad permanente (Álvarez-Sabin, 2011).

En cuanto a España, las estadísticas indican que las tres cuartas partes de los ictus afectan a pacientes mayores de 65 años (Catala-Lopez et al., 2014). Las mujeres presentan su primer ictus con una edad mayor que la de los hombres ($74,6 \pm 11,4$ años Vs $68,8 \pm 11,9$) (Roquer et al., 2003). Respecto a la mortalidad, una persona muere cada quince minutos debido a un ataque isquémico cerebral, convirtiéndose en la segunda causa de muerte, después de la cardiopatía isquémica. Según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), en el año 2009, el número de muertes por enfermedades cerebrovasculares agudas fue de 31.157 de las 384.933 defunciones totales, siendo la tercera causa de fallecimiento en los hombres (13.216), y la primera

en mujeres (17.941) (Instituto Nacional de Estadística, 2009). La suma de estos factores convierte las ECV en un proceso que genera un elevado coste sanitario y social, consumiendo un 3-4% del gasto sanitario (Alvarez et al., 2006; Matías-Guiu Guía J, 2009). Según las previsiones, España será en el 2050 uno de los países más envejecido del mundo, con lo que se estima un incremento en la incidencia de esta patología en los próximos años (Gallego et al., 2008).

1.1.2. Factores de Riesgo

La identificación de los factores de riesgo permite establecer estrategias y medidas de control en los sujetos que todavía no han padecido la enfermedad (prevención primaria), o si ya la han presentado, prevenir o reducir las recidivas (prevención secundaria). Los factores de riesgo pueden clasificarse como modificables, potencialmente modificables y no modificables. En cualquier caso, la asociación de factores de riesgo incrementa el riesgo de ictus (Sacco et al., 1997; Martínez-Vila and Irimia, 2000; Bentsen et al., 2014; Giralt-Steinhauer et al., 2013). (Tabla 1.1)

FACTORES DE RIESGO ECV		
MODIFICABLES	POTENCIALMENTE MODIFICABLES	NO MODIFICABLES
Hipertensión arterial	Tabaquismo	Edad
Cardiopatías de alto riesgo embolígeno	Alcoholismo	Sexo
Diabetes mellitus	Obesidad	Factores hereditarios
AITs previos	Sedentarismo	Raza/etnia
Estenosis carotídea asintomática	Cardiopatías de bajo-medio riesgo embolígeno	Localización geográfica
Homocisteinemia	Otros: anticonceptivos orales, menopausia, migraña, etc.	Clima
Hipertrofia ventricular		
Dislipemias		

Tabla 1.1. Factores de riesgo para el ictus. Tomado de Ruíz-Giménez et al., 2002

No modificables: Son aquellos factores que vienen determinados en la propia persona, no se puede intervenir médicamente en ellos.

- **Edad.** A partir de los 55 años, el riesgo de padecer un ictus se duplica cada diez años (Instituto Nacional de Estadística, 2002). Pasados los 85 años de edad, acabará afectando a uno de cada cuatro hombres y a una de cada cinco mujeres (Moreno et al., 2008). En personas jóvenes existe una mayor prevalencia del infarto cerebral de causa indeterminada, mientras que en personas mayores de 45 años la mayor prevalencia es la enfermedad arteroesclerótica (Kristensen et al., 1997; Farooq and Gorelick, 2013).
- **Sexo.** La incidencia del infarto cerebral es un 30% mayor en hombres que en mujeres. No obstante, la mortalidad es mayor en mujeres (Appelros et al., 2009).
- **Raza.** Los afroamericanos y los orientales muestran en los estudios una mayor incidencia y mortalidad por infarto cerebral que la raza caucásica (Markus et al., 2007).

Potencialmente modificables: Son aquellos factores en los que aún no está bien establecido el nivel de evidencia, grado de asociación y riesgo relativo.

- **Tabaquismo.** Fumar aumenta el riesgo relativo de infarto cerebral de una forma dosis dependiente hasta el doble frente a una persona no fumadora. Si cesa el hábito, el elevado riesgo de padecer un ictus se reduce pasados 2-4 años (Lind et al., 2004).
- **Alcoholismo.** Un elevado consumo de alcohol está relacionado con un elevado riesgo de sufrir un ictus hemorrágico, no tanto isquémico (Goldstein et al., 2006). Aunque algunos estudios sugieren que un consumo moderado del mismo (<30 g/día) podría tener efectos protectores frente al mismo (Sacco et al., 1999).

Modificables: Son aquellos en los que el riesgo de sufrir un ictus y su grado de asociación está bien establecido.

- **Hipertensión arterial (HTA).** Es el factor de riesgo más importante y relacionado con el infarto cerebral. Los valores de presión arterial (PA) tanto diastólica (PAD) como sistólica (PAS) mantienen una relación lineal con la morbimortalidad cardiovascular y vascular cerebral (Gorelick et al., 1999). El 60% de los pacientes que sufren un ictus presentan HTA. Reduciendo la presión arterial 5-6 mmHg se reduce un 40-50% el riesgo de infarto cerebral (Di and Papa, 2003).
- **Diabetes mellitus.** Los pacientes con Diabetes mellitus tienen mayor susceptibilidad de desarrollar arterioesclerosis, mayor prevalencia de HTA, obesidad y dislipemia, por lo que existe una relación directa entre el grado de intolerancia a la glucosa y el incremento del riesgo de padecer un ictus (Fuentes et al., 2012). Los pacientes con diabetes tipo II (no insulino-dependientes, el 90% de los casos) tienen mayor riesgo que los pacientes insulino-dependientes (Martínez-Vila and Irimia, 2000). Un estricto control de la glucemia parece reducir de forma indirecta el perfil dislipémico reduciendo el riesgo de ictus y disminuyendo las complicaciones microangiopáticas (retinopatía, nefropatía y neuropatía) (Furie K L et al., 2002).
- **Dislipemias.** Determinados tipos de infarto cerebral se ven favorecidos por elevados niveles de colesterol LDL. Varios estudios han demostrado la eficacia de las estatinas (pravastatina, simvastatina y lovastatina) sobre la reducción de la mortalidad cardiovascular y del ictus (Gil-Nunez and Villanueva, 2001). La disminución de los niveles de colesterol LDL en plasma se ha relacionado con una reducción en la incidencia del ictus y de la cardiopatía isquémica (reducción del 31%). Asimismo, bajos niveles de colesterol HDL representan un factor de riesgo independiente e importante para el ictus isquémico (Martínez-Vila and Irimia, 2000).

1.1.3. Clasificación

Las enfermedades cerebrovasculares han sido clasificadas según diversos aspectos como son: el origen de la lesión, el tamaño, la morfología, la evolución, la topografía y/o la etiología.

Las clasificaciones más relevantes han sido llevadas por el National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS), estando vigente la correspondiente al año 1990 (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 1990), el Trial of Org 10172 in Acute Stroke Registry (TOAST) (Adams PH et al., 1993), el Lausanne Stroke Registry (LSR) (Castillo V and Bogousslavsky J, 1997), así como las realizadas por el Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología (Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología., 1992).

Según su naturaleza, NINCDS, clasifica la enfermedad cerebrovascular en isquémica o hemorrágica. (Figura 1.1)

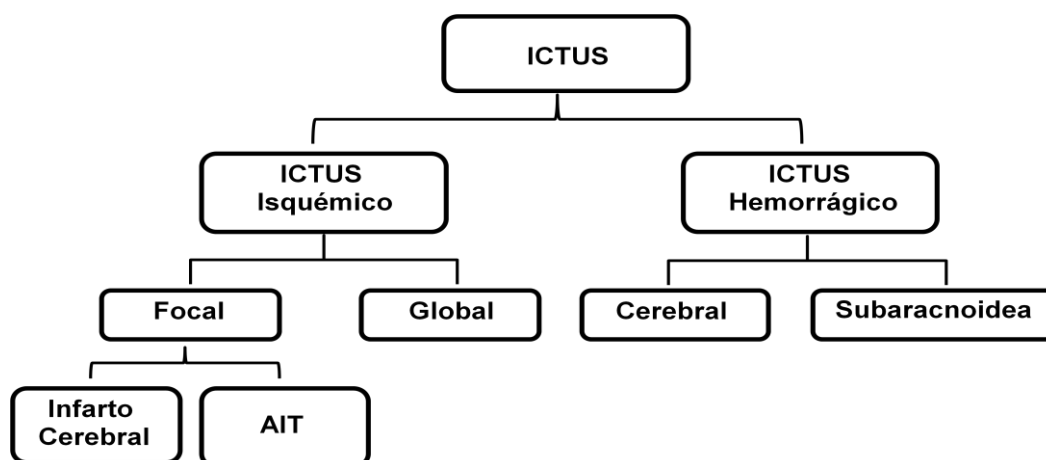


Figura 1.1. Clasificación enfermedades cerebrovasculares según su naturaleza. Modificado de Díez-Tejedor et al., 2001.

La hemorrágica se presenta en el 15% de los casos. Es la presencia de sangre tanto en el espacio subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea) como en el parénquima o en el interior de los ventrículos cerebrales (hemorragia cerebral) (Díez-Tejedor et al., 2001).

Por otro lado, la isquemia que se presenta en una proporción del 85% de los casos, se produce por una disminución del aporte sanguíneo cerebral que puede afectar a

todo el encéfalo de manera simultánea causada por hipotensión arterial debido a un paro cardíaco, a una cirugía con circulación extracorpórea o cualquier cuadro de shock prolongado (isquemia global) o de forma parcial (isquemia focal). A su vez, según la duración del accidente isquémico focal, se puede dividir en accidente isquémico transitorio (AIT) o en infarto cerebral, dependiendo de si el déficit isquémico revierte o no antes de 24 horas (Díez-Tejedor et al., 2001).

El AIT es un episodio isquémico de duración inferior a 24 horas. Es reversible y tras su finalización no existe un déficit neurológico permanente, generalmente dura 15 minutos. Según su topografía se clasifica en retiniano, hemisférico cerebral, de cerebelo y troncoencefálico. Dependiendo del territorio vascular afectado se distinguen AIT carotídeos o vertebrobasilares (Díez-Tejedor et al., 2001).

El infarto cerebral es un episodio isquémico prolongado en el tiempo, lo que produce un área de necrosis tisular. Se han diferenciado tres mecanismos de producción de infarto cerebral: trombótico, embólico y hemodinámico. Según el territorio arterial afectado los síntomas serán diferentes (Díez-Tejedor et al., 2001).

El 65% de los accidentes cerebrovasculares, que resultan de una oclusión vascular, presentan lesiones en el territorio de la Arteria Cerebral Media (*Middle Cerebral Artery*, MCA), el 15% en el tronco cerebral y el cerebelo, el 9% en el territorio de las arterias cerebrales posteriores, el 2% en el territorio de la arteria cerebral anterior y el resto en regiones limítrofes o múltiples (Bogousslavsky et al., 1988).

La MCA comienza en la bifurcación de la arteria carótida interna, y está conectada con el resto de las arterias principales que irrigan el cerebro (arterias cerebrales anteriores y posteriores) por medio del Polígono de Willis localizado en la base del cerebro (Figura 1.2). Esta estructura vascular asegura la redistribución de la sangre en la situación de obstrucción vascular extracerebral (arterias vertebrales o carótidas) asegurando que el cerebro siga siendo eficazmente irrigado (Zulch, 1985). La mayor parte de las isquemias por oclusión en la MCA se deben a la formación de coágulos, aunque puede existir una estenosis ateromatosa. Esta oclusión puede originar, en principio, un déficit motor por la afectación aislada del territorio profundo, que ocurre si existe una perfusión colateral adecuada en la superficie cerebral. En el caso de que el coágulo se rompa, puede migrar distalmente ocluyendo ramas y provocando síndromes parciales según la zona que acabe afectando (Díez-Tejedor et al., 2001).

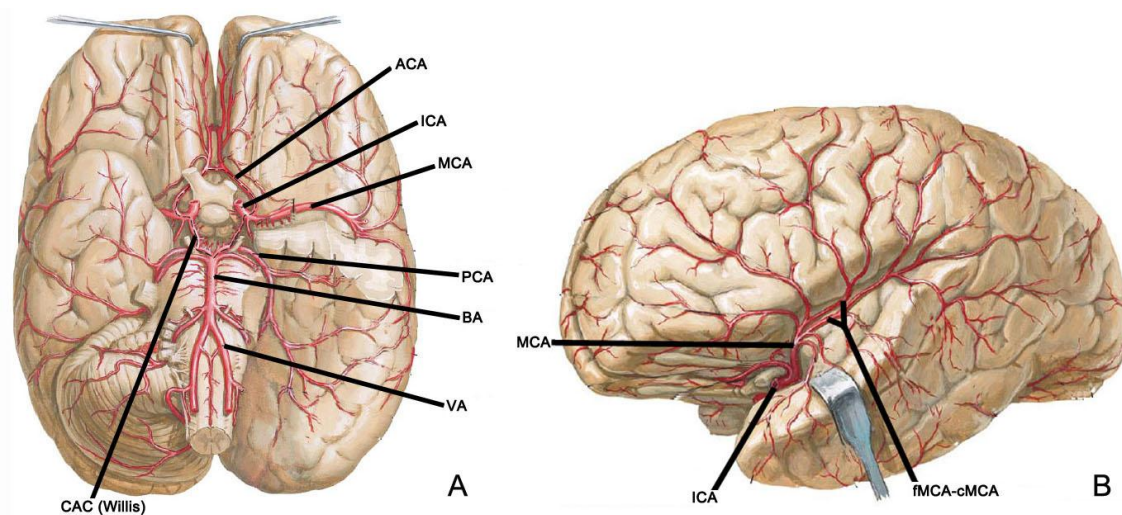


Figura 1.2 Anatomía de la MCA y Polígono de Willis en cerebro humano. Modificado de Netter. Fig.1.2A. Vista basal del cerebro: ACA: Arteria Cerebral Anterior; ICA: Arteria Carótida Interna; MCA: Arteria Cerebral Media; PCA: Arteria Cerebral Posterior; BA: Arteria Basilar; VA: Arteria Vertebral; CAC (Willis): Círculo Cerebral Arterial (Polígono de Willis). Fig. 1.2B. Vista lateral del cerebro: MCA: Arteria Cerebral Media; ICA: Arteria Carótida Interna; fMCA-cMCA: ramas frontal y caudal de Arteria Cerebral Media.

1.1.4.Tratamiento

Como ya se ha explicado anteriormente, el ictus puede deberse a diferentes causas y hay que tener en cuenta los distintos factores de riesgo. Existen dos tipos de prevención: primaria y secundaria. La prevención primaria intenta evitar el ictus en los pacientes que nunca han sufrido ninguno, conociendo los factores de riesgo presentes en el paciente. La prevención secundaria intenta evitar que se repita el ictus en los pacientes que ya lo han sufrido. En ambos casos, los consejos que pueden aplicarse como preventivos son: controlar los niveles de colesterol y glucemia, la presión arterial, el peso, hacer ejercicio con regularidad y mantener una dieta equilibrada.

Una vez sufrido un primer ictus, los tratamientos que se siguen pueden dividirse en:

- **Endarterectomía o angioplastia.** La alteración de arteria carótida interna (estenosis por aterotrombosis) es responsable del 20% de los casos anuales de ictus. Esto puede solucionarse por dos procedimientos según la situación del paciente: endarterectomía (retirar la placa que se ha formado en una arteria) y angioplastia (introducir una malla para dilatar una arteria ocluida mediante una angiografía). Como desventaja está que en caso de que el paciente sufra otras patologías o que la arteria afectada se encuentre

totalmente ocluida, estas técnicas no son útiles y sólo podría aplicarse tratamiento médico. Asimismo, si la oclusión de la arteria es inferior al 50%, los riesgos de la intervención son mayores que los riesgos de sufrir un nuevo ictus (Castellví, 2007).

- **Evitar los coágulos cardiacos.** La Fibrilación Auricular (el tipo de arritmia cardiaca más frecuente) tiene como consecuencia la formación de coágulos. Es por esto, que pacientes que lo hayan sufrido tienen mayor riesgo de padecer un ictus. Para evitar que se formen coágulos y trombos, existen diferentes anticoagulantes orales como Acenocumarol y Warfarina. Sin embargo, aunque el tratamiento con anticoagulantes orales es efectivo para prevenir nuevos ictus isquémicos, hay que tener en cuenta que no está exento de riesgos, siendo el más grave la hemorragia (Castellví, 2007).
- **Fármacos antiplaquetarios.** Disminuyen el riesgo de un nuevo ictus un 25%. Estos fármacos antitrombóticos (anticoagulantes), trombolíticos (r-tPA) y neuroprotectores (citicolina) evitan o disgregan la acumulación de plaquetas que dan lugar a la trombosis arterial. Algunos fármacos antiplaquetarios, como la Aspirina, pueden tener efectos secundarios como molestias gastrointestinales o hemorragia digestiva, incluso agravar el ictus hemorrágico (Castellví, 2007).

1.1.5.Fisiopatología

El tejido cerebral tiene un consumo relativamente elevado de glucosa y oxígeno, dependiendo, casi exclusivamente, de la fosforilación oxidativa para producir energía.

Al ocluirse, de manera permanente o transitoria, alguna de las arterias que irrigan el cerebro, disminuye el flujo sanguíneo y con ello, el aporte de oxígeno y glucosa en el territorio del vaso afectado. Durante escaso tiempo, y cuando el suministro de sangre colateral no es suficiente para mantener un flujo sanguíneo normal en el territorio de la arteria obstruida, esta reducción puede ser compensada por mecanismos fisiológicos de regulación del flujo (Hossmann, 2006).

Por un lado, una reducción moderada del aporte de oxígeno se equilibra con un aumento del flujo sanguíneo cerebral, pero una presión inferior a 40 mmHg provoca confusión y, por debajo de 20 mmHg lleva al coma. Una situación de hipoxia

exclusivamente no es la responsable de daño cerebral agudo, ha de estar acompañada de procesos de isquemia o acidosis (Castillo et al., 1995). La hipotensión arterial potencia los efectos de la hipoxia, como ocurre en la parada cardiorrespiratoria. Si la situación persiste, se desencadena un daño cerebral irreversible, viéndose afectada la sustancia gris, zonas vasculares fronterizas y territorios arteriales más distales (Siesjo et al., 1995; Pulsinelli, 1985; Hossmann, 2006).

Por otro lado, una situación de hipoglucemia mantenida desencadena alteraciones funcionales y estructurales. Concentraciones de glucosa inferiores a 20 mg/dL originan confusión, y por debajo de 10 mg/dL llevan al coma. La capacidad de reserva de glucosa o glucógeno del cerebro es reducida, pudiendo cubrir los requerimientos energéticos durante cortos periodos de tiempo, sin secuelas neurológicas. En los casos de ayuno prolongado, las células cerebrales obtienen su energía a partir de los cuerpos cetónicos, y comienzan a aparecer lesiones estructurales, consistentes en una necrosis neuronal cortical selectiva, con preservación del tejido glial, acompañada de una disminución del consumo de oxígeno (Shiraishi et al., 1989).

En situaciones fisiológicas, el flujo sanguíneo de un parénquima cerebral sano es superior a 50 mL/100g/min y es independiente de variaciones de la presión de perfusión, a través de mecanismos de autorregulación de la circulación cerebral, donde intervienen factores bioquímicos, miogénicos y neurogénicos. En situaciones isquémicas, se produce una alteración de estos mecanismos de autorregulación en el territorio afectado y la presión de perfusión se vuelve dependiente de la tensión arterial (Paulson et al., 1990).

Cuando el flujo sanguíneo cerebral (FSC) disminuye por debajo de 10 mL/100g/min, se produce una muerte celular rápida (Pulsinelli, 1992). Normalmente, existe una zona hipoperfundida entre el **núcleo isquémico**, cuya extensión depende del funcionamiento de la circulación colateral (Heiss and Graf, 1994; Castillo, 2000). Dentro de esta zona pueden diferenciarse dos regiones: una región con $FSC > 22$ mL/100g/min conocida como **zona oligohémica**, donde el riesgo de convertirse en infarto sólo sucede en circunstancias adversas; y otra región con $FSC < 22$ mL/100 g/min denominada **penumbra isquémica** en la que el consumo de oxígeno es todavía suficiente para preservar la supervivencia tisular (Baron JC, 2001; Heiss ATD et al., 2001).

En esta área de penumbra isquémica, las células aún mantienen su integridad estructural. Sin embargo, ocurren alteraciones en su actividad funcional (Figura 1.3). El aporte de oxígeno no es suficiente para mantener un correcto metabolismo oxidativo de la glucosa, provocando acidosis láctica; el contenido de ATP se mantiene parcialmente, afectando el funcionamiento de las bombas iónicas y, con ello, la transmisión sináptica; disminuye el contenido de glucosa y la reactividad al anhídrido carbónico se mantiene parcialmente (Ginsberg and Pulsinelli, 1994; Castillo, 1999). Si esta zona de penumbra no es controlada adecuadamente puede progresar a infarto cerebral.

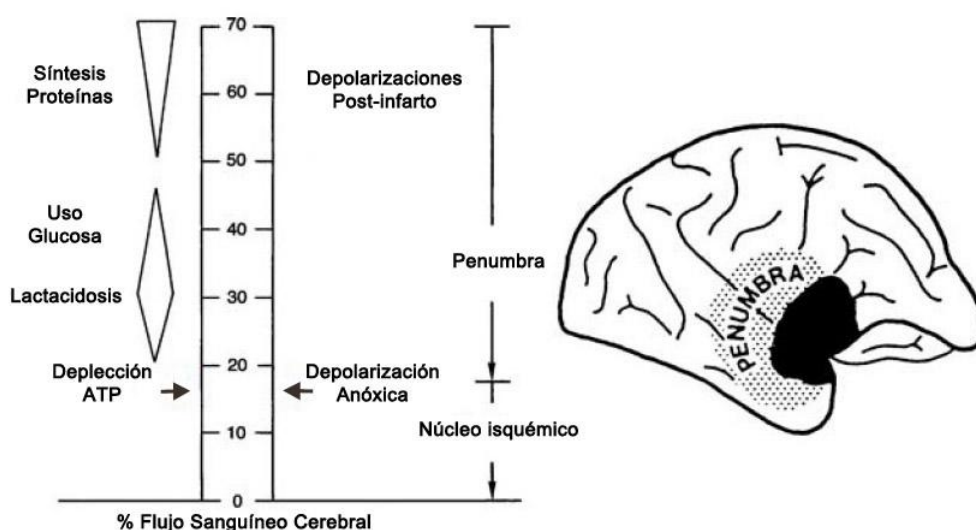


Figura 1.3. Esquema funcional y morfológico del núcleo isquémico y la zona de penumbra. Modificado de KA Hossmann 2006

La importancia de esta zona, se centra en la hipótesis de que las neuronas localizadas aquí pueden recuperarse cuando mejoren las condiciones hemodinámicas y se restaure el FSC en un periodo limitado de tiempo (Hakim, 1987). Además, la zona de penumbra es interesante para la comprensión fisiopatológica del ictus, no sólo por la evolución progresiva del daño isquémico, sino también como área de actuación terapéutica para revertir la sintomatología neurológica tras un ictus (Hossmann, 1994; Fisher, 2004; Guadagno et al., 2004). De aquí que se disponga de una ventana temporal de actuación y aplicación de tratamiento (Figura 1.4).

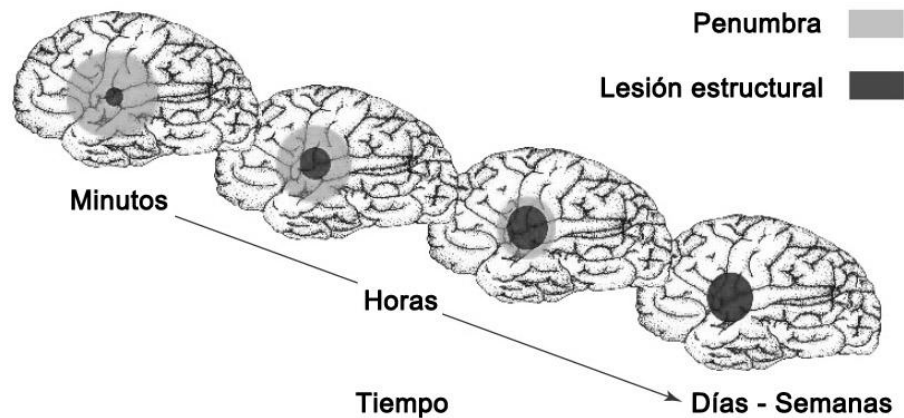


Figura 1.4. Aumento progresivo de la lesión estructural sobre la zona de penumbra. Modificado de U Dirnagl, et al. 1999

1.1.5.1. Cascada Isquémica

Una vez ocurrido el accidente isquémico, se desencadena una serie de procesos bioquímicos (conocida como cascada isquémica) que desembocan en la destrucción del parénquima cerebral. Estos procesos bioquímicos son distintos entre las neuronas, la glía y el componente vascular dentro de esta cascada isquémica (Figura 1.5).

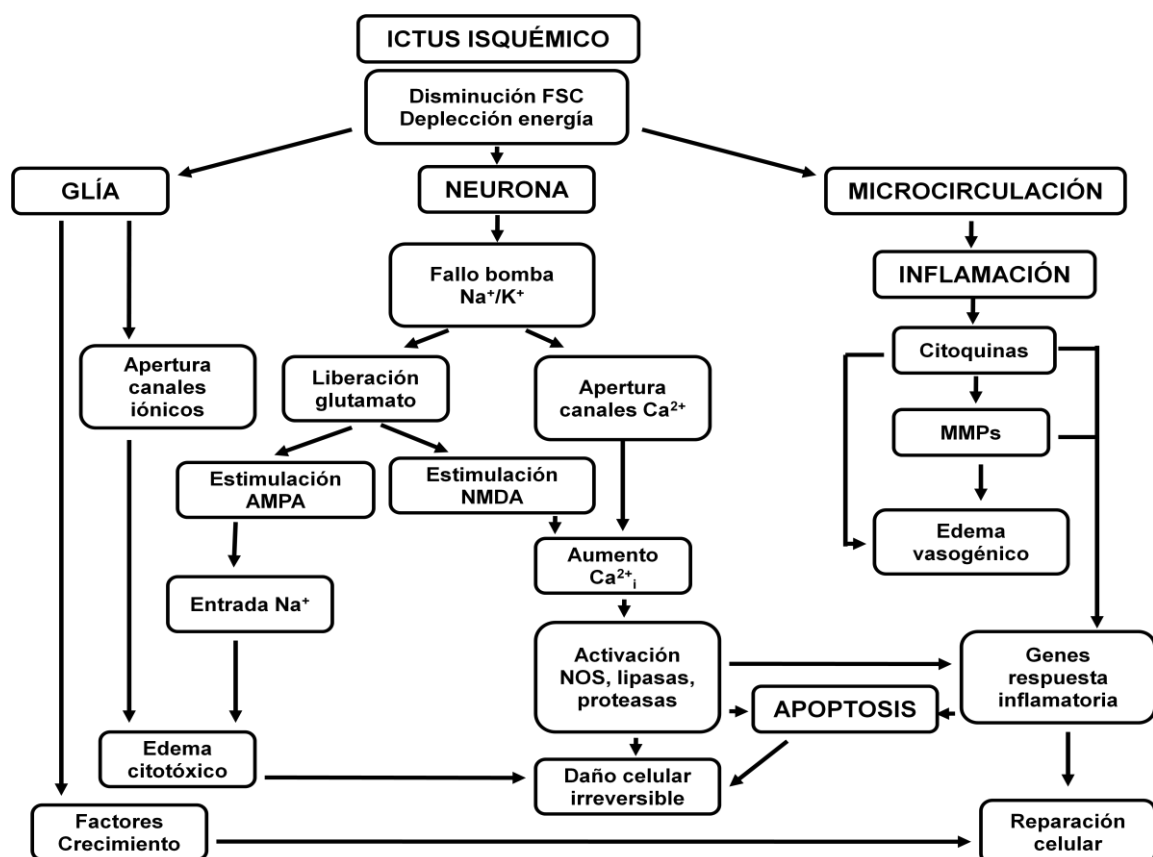


Figura 1.5. Cascada Isquémica. Modificado de Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral de J. Castillo, 2001

1.1.5.1.1. Componente Neuronal

La interrupción del flujo sanguíneo provoca una disminución en el aporte de oxígeno y glucosa y con ello impide que la región de cerebro afectada pueda generar el ATP necesario para mantener su demanda de energía (Moskowitz et al., 2010). Esta falta de energía se traduce en un fallo del funcionamiento de las bombas iónicas de Na^+/K^+ , lo que origina una rápida deplección del K^+ intracelular y con ello una pérdida progresiva del potencial de membrana. La pérdida de gradiente iónico provoca una despolarización de las neuronas, lo que lleva a la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y el desbloqueo de algunos canales de Ca^{2+} receptor-dependientes. Como consecuencia, entran grandes cantidades de Ca^{2+} en el interior de las membranas (Ransom and Philbin, Jr., 1992; Gribkoff and Winkquist, 2005; Zhao et al., 2012b). La concentración de Ca^{2+} aumenta hasta aproximadamente el doble de su valor fisiológico. Este aumento de Ca^{2+} ocurre en dos fases. La primera fase no es la responsable directa de la muerte celular (Celsi et al., 2009). Esta situación mantiene una fuerte despolarización de la membrana neuronal, que causa un aumento de la liberación de glutamato y de otros aminoácidos excitadores que al sobrepasar límites tolerables generan fenómenos de excitotoxicidad (Pulsinelli, 1992; Ginsberg MD, 1997).

Esta elevada liberación de glutamato (100 μM) ha sido reconocida como un neurotóxico potente durante más de cincuenta años (Lucas and Newhouse, 1957). Dicha situación ha sido denominada excitotoxicidad, y provoca la muerte neuronal postsináptica, como consecuencia de una prolongada y fuerte activación de los receptores ionotrópicos, fundamentalmente el receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) y el receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), así como receptores metabotrópicos postsinápticos (Novelli et al., 1988; Meldrum et al., 1985; Parsons and Raymond, 2014; Zhao et al., 2012a; Terasaki et al., 2014).

La estimulación de los receptores AMPA provoca un aumento de la concentración de Na^+ intracelular, ocasionando edema celular, que se ve favorecido por una entrada pasiva de agua que sigue el flujo iónico. Por otro lado, la estimulación de los receptores NMDA es la responsable de la segunda fase del aumento de Ca^{2+} intracelular y lo que directamente inicia la cascada isquémica originando la muerte celular dependiente de calcio (Ginsberg MD, 1997). En cultivos de células corticales, la activación sostenida durante (3-5) minutos de NMDAR es suficiente para destruir la mayoría de las neuronas. En cambio, la excitotoxicidad de Ca^{2+} por la activación de

AMPA, se produce más lentamente, requiriendo horas para inducir una lesión letal en los mismos cultivos celulares (Simeone et al., 2004). La activación de los receptores metabotrópicos, por la liberación de glutamato, provoca un incremento del Ca^{2+}_i por la liberación de éste, desde sus depósitos intracelulares (Choi, 1988).

El nuevo aumento de los niveles de Ca^{2+}_i inicia una serie de procesos citoplasmáticos y nucleares que desembocan en un daño dramático del tejido. Se activan enzimas como las fosfolipasas calcio-dependientes, proteasas, endonucleasas, óxido nítrico sintasas (NOS), que degradan proteínas del citoesqueleto (actina y espectrina 6), de la matriz extracelular (laminina 7) y los ácidos nucleicos. Además, se produce una disfunción mitocondrial por la apertura de los poros, interrupción de la cadena respiratoria, por la acumulación de electrones libres y, la liberación de NADH y del Citocromo C (Castillo, 1999; Schild et al., 2003).

Los electrones libres, que se acumulan en la mitocondria desestabilizada, son capaces de reaccionar con el oxígeno procedente de una reperfusión, causando la producción de aniones superóxidos (O_2^-). A esto se une que la activación de NMDAR causa un aumento en la expresión y activación de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) y fosfolipasa A_2 en neuronas isquémicas. COX-2 contribuye a la sobreproducción de superóxidos, mientras que la fosfolipasa A_2 lleva a la liberación ácido araquidónico, prostaglandinas y tromboxanos. El metabolismo del ácido araquidónico produce anión superóxido (O_2^-) que vuelve a estimular la fosfolipasa A_2 , constituyendo un *feedback* positivo (Miettinen et al., 1997; Siesjö BK, 1994). Es el O_2^- , el radical libre de oxígeno (RLO) que inicia la cascada del estrés oxidativo en la isquemia cerebral. Sin embargo, se forman otros RLO que incrementan los efectos nocivos de éste, como son el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y en parte, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por la Superóxido dismutasa (SOD-1) a partir del anión superóxido. La formación de óxido nítrico (NO), por parte de las óxido nítrico sintasas, es la responsable de la producción de otros RLO como el peroxinitrito (ONOO^-) cuando reacciona con el superóxido (Dawson and Dawson, 1996a; Rodrigo et al., 2005). En otro capítulo se explican más detalladamente las implicaciones fisiológicas y las características del óxido nítrico. La elevada formación de radicales libres de oxígeno ocasiona alteraciones celulares, por la oxidación de lípidos, ADN y proteínas, al exceder la capacidad antioxidante de la neurona. El Malondialdehído (MDA) es un producto resultante de la peroxidación lipídica, comúnmente usado como marcador de estrés oxidativo (Bulut et al., 2013).

Simultáneamente a la liberación de glutamato, la anoxia induce la liberación extracelular de Ácido Gamma-AminoButírico (GABA). Este neurotransmisor inhibitorio aumenta su concentración pero este incremento no es tan elevado ni persiste tanto como el del glutamato (Globus et al., 1988). Su efecto inhibitorio lo ejerce por dos receptores GABA A y GABA B. La estimulación del receptor ionotrópico GABA A, más significativo en la sustancia gris, origina la entrada de Cl^- en la neurona, facilitando su repolarización. Por otro lado, la estimulación del receptor metabotrópico GABA B, más activo en la sustancia blanca, actúa junto con la proteína G produciendo un segundo mensajero. Estos mecanismos permiten el bloqueo de la entrada de más Ca^{2+} en el interior del axón, disminuyendo los efectos de éste (Fern et al., 1994). Por otro lado, la disminución de la excesiva inhibición tónica promueve una mejora de la recuperación funcional incluso de la plasticidad neuronal en enfermedades cognitivas (Clarkson AN et al., 2010).

A pesar de todo esto, la sustancia gris y la sustancia blanca responden de diferente manera a la hipoxia. La entrada de Ca^{2+} y la consecuente hipótesis excitotóxica son más importantes en la primera que en la segunda. Esto se debe a que en la sustancia blanca no hay sinapsis, ni estructuras pre y post-sinápticas donde puedan actuar el glutamato ni otros aminoácidos neuroexcitadores (Waxman et al., 1990).

1.1.5.1.2. Componente Glial

En un accidente isquémico, no sólo las neuronas se ven afectadas, sino también las células de la glía. Compuesta por diversos tipos celulares, astroglia, oligodendroglía y microglía, juega un papel esencial tanto en el desarrollo de la lesión como en la reparación del tejido (Ransom and Sontheimer, 1992; Ueno et al., 2012; Chu et al., 2012). Un proceso desencadenado por la isquemia es el de hipertrofia de las células gliales, conocido como gliosis reactiva. Éste se ha relacionado con mecanismos de reparación y neuroprotección, por ejemplo aumentando la permeabilidad vascular (Ijichi et al., 1995).

Los astrocitos, en condiciones fisiológicas, se ocupan del soporte de la función neuronal y de la regulación de la actividad metabólica. Destaca su actividad controlando la acción neurotransmisora del glutamato. Cuando la actividad neuronal aumenta los niveles de glutamato en las sinapsis, parte de éste es posteriormente captado por los receptores metabotrópicos de los astrocitos (Porter and McCarthy,

1996). En su interior, el glutamato se convierte en glutamina, la cual puede ser utilizada por las neuronas para la nueva síntesis de glutamato y GABA.

La respuesta de los astrocitos al infarto es extremadamente compleja e incompletamente comprendida. Tras el fallo energético, que ocurre en el ictus, la consecuente despolarización de las membranas, la apertura de los canales iónicos y la entrada de Na^+ y agua conllevan al conocido edema astrocítico. Este edema tiene como consecuencia la disminución de la recaptación fisiológica del glutamato (Schneider et al., 1992; Dong et al., 2013; Swanson et al., 2004).

A su vez, en el núcleo del infarto, hay dos tipos celulares que expresan la molécula adaptadora de unión a calcio inoizado tipo 1 (Iba1), macrófagos o microglía (Matsumoto et al., 2008). La microglía activada también contribuye al daño tisular con la producción de citoquinas y radicales libres de oxígeno (Lees, 1993; Banati et al., 1993). Aunque otros estudios muestran efectos protectores de la microglía ante los ataques isquémicos (Lippoldt et al., 2005).

Además, los oligodendrocitos, al contrario de las neuronas, son menos sensibles a los mecanismos de excitotoxicidad al no contener sinapsis (igual que el resto de componentes gliales) (Castillo J et al., 1997). Las células progenitoras de oligodendrocitos, que expresan la proteína integral de membrana NG2 (proteoglicano condroitín sulfato) (Trotter et al., 2010), son capaces de atravesar la zona periinfarto para situarse en el límite del mismo, pudiendo inducir mecanismos de reparación (Claus et al., 2013). Estas células NG2 positivas, también llamadas ploidendrocitos, están distribuidas tanto por la materia gris como blanca. Se ha sugerido que migran de la zona subventricular y el cuerpo calloso ipsilateral para inducir estos mecanismos regenerativos (Nishiyama et al., 2009).

1.1.5.1.3. Componente Vascular

Las células endoteliales que forman la microvasculatura del sistema nervioso central (SNC), difieren del resto del endotelio vascular por su capacidad de regular el paso de moléculas o células desde y hacia el parénquima neural, constituyendo la barrera hematoencefálica (BHE) (Wolburg and Lippoldt, 2002). Esta selectividad reside en las características de este endotelio, que incluye la expresión de uniones estrechas, que limitan la permeabilidad paracelular, así como determinados transportadores y receptores que protegen al SNC de una gran variedad de compuestos hidrofóbicos,

permitiendo un adecuado funcionamiento neuronal (Schinkel, 1999; Begley, 2004; Abbott et al., 2006).

La estabilidad de esta barrera hematoencefálica se ve alterada en la fase aguda del ictus, y está asociada con el edema cerebral. Este edema se debe a la acumulación de líquido, a través de la BHE, tanto en el interior de las células (edema citotóxico) como en el intersticio celular (edema vasogénico) (Hatashita and Hoff, 1990). El edema citotóxico se origina por la alteración de la permeabilidad de las membranas celulares y el aumento de la osmolaridad intracelular (por aumento de glutamato y productos de degradación). Según la duración de la isquemia, estos cambios pueden ser reversibles o no. Así, si ocurre una reperfusión rápidamente, la actividad metabólica se normaliza; pero si la reperfusión ocurre más allá de las seis primeras horas desde comienzo del accidente isquémico, el edema se agrava porque el aumento de la presión hidrostática lleva a la aceleración de la extravasación de líquidos (Nordborg et al., 1994).

Aunque la disfunción de la barrera hematoencefálica puede facilitar la inflamación al permitir que células inmunes periféricas entren en el cerebro, esta migración puede modular la permeabilidad de la misma. Los neutrófilos son capaces de mejorar la permeabilidad de la BHE a través de la acción de metaloproteasas de matriz liberadas (Rosell et al., 2008).

Por otro lado, el control del flujo sanguíneo cerebral es modulado por diversos procesos, tanto a través de las neuronas, de la glía (astrocitos y microglía) y de los pericitos. El aumento de glutamato en las sinapsis provoca un aumento de Ca^{2+} en el interior de las neuronas, lo que conlleva la activación de distintas enzimas como las NOS, capaces de producir vasodilatación (Busija et al., 2007). El glutamato es además capaz de modular compuestos derivados de ácido araquidónico de los astrocitos y de las neuronas como las prostaglandinas. Éstas median en la vasodilatación en respuesta a un aumento de los niveles de Ca^{2+} en este tipo de célula glial. En condiciones fisiológicas, están producidas principalmente por la ciclooxigenasa 1 (COX-1) (Takano et al., 2006). Aunque en condiciones patológicas, la expresión de COX-2 aumenta en astrocitos contribuyendo a una mayor síntesis de prostaglandinas (Hirst et al., 1999; Gordon et al., 2008).

Los astrocitos pueden incrementar el flujo sanguíneo también, en respuesta a la actividad neuronal por la liberación de K^+ a partir de sus terminaciones adosadas a las

arteriolas. Un modesto incremento en la concentración de K^+ extracelular hiperpolariza las células del músculo liso (Knot et al., 1996; Paulson and Newman, 1987).

Además, mensajeros metabólicos como el lactato (producido cuando la producción de piruvato por la glucólisis sobrepasa el consumo de piruvato por la fosforilación oxidativa) también contribuyen al aumento del flujo sanguíneo (Ido et al., 2001).

En cuanto a los pericitos, éstos expresan proteínas que provocan la contracción de la microvasculatura (Hamilton et al., 2010). Esta actuación puede ser en respuesta de neurotransmisores por alteraciones de la concentración del Ca^{2+} intracelular. Las señales de contracción pueden propagarse de un pericito a otro por despolarizaciones, y quizás las señales de dilatación puedan propagarse por hiperpolarización (Puro, 2007; Peppiatt et al., 2006).

1.1.5.2. Cascada Inflamatoria

El cerebro es considerado un órgano inmunológicamente privilegiado por la existencia de la barrera hematoencefálica que regula el paso de células inflamatorias y mediadores del torrente sanguíneo hacia el sistema nervioso central (Perry, 1998). Esto significa que dispone de células inflamatorias, como la microglía y los macrófagos, encargados de recibir y propagar las señales inflamatorias. En la respuesta inflamatoria del SNC se activa la microglía, además de los astrocitos ocurriendo, en caso de desestabilización de la BHE, una limitada invasión de células inflamatorias circulantes (Kaur and Ling, 2008).

La microglía constituye el 5-15% de la población celular cerebral y se encuentra involucrada principalmente en la vigilancia inmune (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). En condiciones fisiológicas mantiene una morfología ramificada (Aloisi, 2001) mientras, que tras un accidente isquémico, a las 4-6 horas, la microglía retrae sus procesos tomando una morfología ameboidea, típica de la microglía activada y adquiriendo características de los macrófagos, como actividad fagocítica, producción de citocinas inflamatorias y presentación de antígenos (Garden and Moller, 2006). Pasadas 24 horas, la reacción microglial está bien desarrollada, principalmente en el área de penumbra.

A su vez, tras un ictus, los astrocitos se activan, incrementándose la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) dando lugar a la gliosis reactiva (Che et al., 2001;

Pekny and Nilsson, 2005). Son entonces capaces de secretar moléculas inflamatorias, como citocinas y quimiocinas, y de expresar proteínas, como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Dong and Benveniste, 2001).

Al desestabilizarse la BHE, se acumulan, en el cerebro isquémico, células inflamatorias como fagocitos periféricos, linfocitos T y leucocitos. Estos últimos son, junto con la microglía, las células inflamatorias más activas. Se adhieren a la pared de los vasos, interactuando con las células endoteliales, lo que lleva a una mayor acumulación de estas células y a la liberación de mediadores proinflamatorios. Esta acumulación puede contribuir a una mayor disminución del flujo sanguíneo (Barone and Feuerstein, 1999). Los neutrófilos llegan 6 horas después del comienzo de los síntomas de la isquemia, aumentando su concentración hasta las 24 horas, para disminuir a continuación (Akopov et al., 1996). Los monocitos llegan sobre las 12 horas para transformarse en macrófagos y fagocitar la materia orgánica muerta, y finalmente, llegan los linfocitos al parénquima cerebral.

La inflamación post-isquémica se desarrolla y contribuye al daño tisular por la liberación de diversos mediadores como son citoquinas (IL-6, IL-1, TNF- α), NOS inducible (iNOS), metaloproteasas de matriz (MMP9) y prostaglandinas sintetizadas por las ciclooxygenasas (COX-2).

Las citoquinas son glicoproteínas capaces de interactuar entre ellas y con muchos tipos celulares. La interleuquina 1 (IL-1) junto con el factor de necrosis tumoral (TNF- α) se activan rápidamente tras una isquemia y son los que inician la respuesta inflamatoria (Hallenbeck, 1996). En cambio, las interleuquinas 6 y 8 (IL-6, IL-8) inducen una segunda respuesta inflamatoria más persistente con fiebre (Rothwell et al., 1991) y la liberación de adhesinas, que originan la agregación leucocitaria a la pared vascular. Además, IL-6 está implicada además en la regulación de la apoptosis neuronal (Herrmann et al., 2003).

Por otro lado, la IL-6 y el TNF- α son capaces de estimular la expresión de la metaloproteinasas de matriz (MMP9) (Montaner et al., 2001; Kusano et al., 1998). Las metaloproteinasas (MMPs) son enzimas proteolíticas encargadas del remodelado de la matriz extracelular, pero en condiciones patológicas atacan sustratos como parte de una respuesta neuroinflamatoria (Rosenberg et al., 1998). La MMP9 junto con la MMP2 son las responsables de la desestabilización de la barrera hematoencefálica que desemboca en un edema vasogénico (Fujimura et al., 1999). La MMP9 es capaz

de degradar el colágeno tipo IV sintetizado por células endoteliales, desestructurando así los vasos sanguíneos (Kurzepa et al., 2014).

1.1.5.3. Cascada Apoptótica

Cuando disminuye el flujo sanguíneo en el cerebro por un accidente isquémico se alteran progresivamente la transmisión sináptica, el transporte de iones y la integridad estructural hasta producir la muerte de las células nerviosas. Según la densidad neuronal, el metabolismo y la perfusión de la zona, las neuronas serán más o menos vulnerables. Así, por ejemplo, las neuronas de corteza o hipocampo son más sensibles que las de otras áreas y que las células gliales (Murayama et al., 1990).

En el cerebro isquémico, como ya se ha explicado anteriormente, se diferencian dos zonas donde la muerte celular ocurre por dos procesos. El área adyacente al vaso afectado denominada núcleo (*core*), región en la que la muerte celular ocurre rápidamente por necrosis y donde el daño es irreversible. La zona que rodea al núcleo, denominada penumbra que, al encontrarse hipoperfundida, aún mantiene la integridad estructural pero tiene fallos en el funcionamiento, y la muerte celular avanza más lentamente por apoptosis (Dirnagl et al., 1999).

Los mecanismos de muerte por necrosis están relacionados con el fallo de energía debido a la disminución de niveles de ATP en la célula (Leist et al., 1997; Eguchi et al., 1997). Los niveles de ATP son determinados por el consumo de glucosa, la síntesis y el consumo de ATP. La disminución de los niveles de ATP afecta a las bombas iónicas, lo que acaba llevando al aumento de la concentración de Ca^{2+} en el interior de las neuronas. Este hecho hace que se activen enzimas como fosfolipasas o calpainas.

Las calpainas en condiciones fisiológicas median en diferentes funciones homeostáticas. Sin embargo, en un cerebro isquémico contribuyen a la muerte celular por la escisión de múltiples sustratos, incluyendo las proteínas del citoesqueleto y transportadores de membrana (Yamashima et al., 1996; Yamashima, 2004). Además, truncan un número de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o Bid (Small et al., 1999), a la vez que estimulan la sobre regulación de la actividad proapoptótica de Bax, (Wood et al., 1998) que permite la activación de la cascada de Caspasa 3 (Chan and Mattson, 1999). Esto lleva a la subsiguiente pérdida de la integridad estructural y a trastornos del transporte axonal, y finalmente a la muerte celular necrótica.

En la zona de penumbra la muerte celular sigue un proceso de apoptosis conocido como mecanismo de suicidio, regulado por un programa genético conservado durante la evolución. La estimulación o inhibición de proteínas, como Bcl-2, Caspasa 3 y Bax, tiene un papel crucial en la activación y ejecución de la apoptosis (Li and Yuan, 2008).

Los mecanismos de muerte por apoptosis incluyen la activación de la ruta de la Caspasa 3, que es una cisteín proteasa, que acaba con la fragmentación nuclear como paso final (Chen and Goeddel, 2002; Danial and Korsmeyer, 2004). Uno de los mecanismos ocurre a través de las mitocondrias donde se liberan factores iniciadores de la apoptosis desde los poros de membrana de las mismas, lo que lleva a la formación del apoptosoma y la activación de Caspasa 3 (Kroemer, 1997; Martinou and Green, 2001; Zamzami and Kroemer, 2001). La liberación de Citocromo C forma el apoptosoma, junto con la procaspasa 9. La activación de Caspasa 9 activa a su vez a la Caspasa 3. Ésta cataliza la polimerasa ADP-ribosa (PARP) cuya activación desemboca en la fragmentación del ADN (Enari et al., 1998; Sakahira et al., 1998). Estos acontecimientos mantienen la formación del apoptosoma. Por otro lado, la apertura de los poros de membrana mitocondriales son regulados por proteínas de la familia de Bcl-2. Bax estimula la apertura, mientras Bcl-2 inhibe ese estado a través de una amplia señal de amplificación (Tsujimoto, 2002; Cory et al., 2003). La proporción entre los niveles de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas en la mitocondria o su translocación dentro de la membrana mitocondrial son la causa principal de la inducción de la apoptosis.

Como resumen, el siguiente esquema muestra el desarrollo temporal de los diferentes acontecimientos que se desembocan tras un ataque isquémico y algunos de sus marcadores. (Figura 1.6)

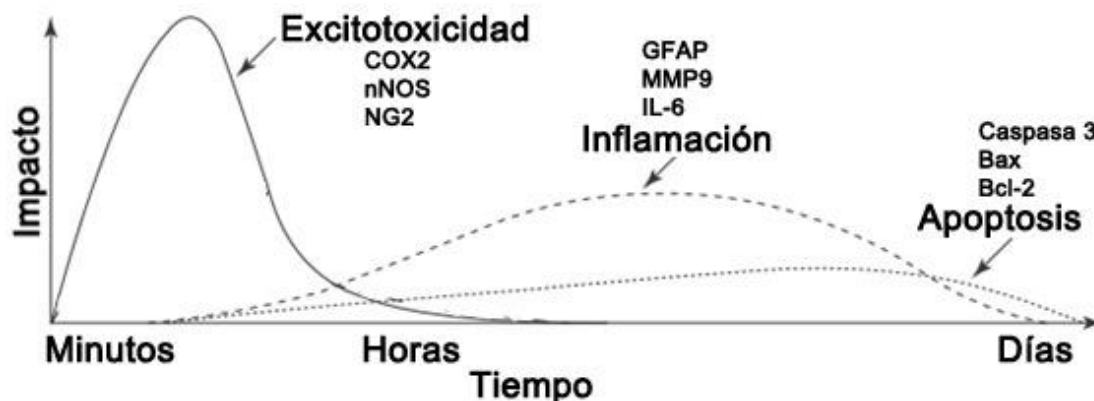


Figura 1.6. Resumen temporal de las cascadas isquémica, inflamatoria y apoptótica. Modificado de U Dirnagl 1999.

1.1.6. Neurorreparación y Angiogénesis tras la Isquemia

Tras haberse producido una isquemia, hay estudios que demuestran un incremento en la neurogénesis y angiogénesis en el cerebro (Kokaia and Lindvall, 2003b). La neurogénesis en un individuo adulto se encuentra localizada en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (ZSG), así como en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales (Cameron and McKay, 1998). Se distinguen tres etapas en este proceso; la proliferación (donde se expresan factores de crecimiento de los fibroblastos y epidérmicos (bFGF y EGF, respectivamente) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la migración (donde participan factores quimiotróficos como integrinas, efrinas y reelinas) y la diferenciación e integración (regulada por astrocitos) (Hurtado et al., 2006). Es por esto, que la neurogénesis, sobre todo en su etapa de migración, puede estar íntimamente relacionada con la angiogénesis e incluso con la vasculogénesis y que todo esto esté implicado en la mejora funcional del tejido tras un ictus (Ohab et al., 2006; Thored et al., 2007).

La zona subventricular se divide en cuatro capas, siendo las más interesantes las capas II y III, donde algunos astrocitos podrían retener actividad proliferativa (Quinones-Hinojosa et al., 2006). Las células tipo B localizadas ahí, son células de tipo astrocitario que expresan GFAP, además de nestina y vimentina. De éstas, algunas pasarán a ser células C, que son células de alta tasa de proliferación y que pueden derivar en células de tipo A que son neuroblastos que expresan doblecortina (DCX) y β -III-tubulina (Garcia-Verdugo et al., 1998; Arias-Carrion et al., 2007).

Los neuroblastos tienen la capacidad de poder desviarse de la corriente migratoria rostral hacia el hemisferio lesionado (Arvidsson et al., 2002; Li et al., 2008). Estos neuroblastos interactúan activamente con el microambiente hasta alcanzar la zona que rodea el infarto. Tras esta etapa de migración, estas células procedentes de la ZSV se diferencian en neuronas maduras o glía (Zhang et al., 2007a; Yamashita et al., 2006). Esta proliferación de neuronas y glía en la ZSV no disminuye al aumentar la edad, cuando se han comparado ratas entre 4 meses y un año (Chen et al., 2003b). Esta neurogénesis se encuentra aumentada tras una isquemia, aunque en el animal adulto en un estado basal se encuentre atenuada (Jin et al., 2004; Maslov et al., 2004). Las células endoteliales proliferan en las zonas adyacentes al infarto, entre las 12 y 24 horas siguientes al accidente isquémico, lo que permite la angiogénesis incluso 3 días después del mismo. De hecho, esta angiogénesis activa se ha observado en pacientes humanos entre 3-4 días después del ictus (Beck and Plate, 2009).

En pacientes humanos, se ha observado una recuperación funcional mayor o menor en un tiempo superior a seis meses. Esto puede explicarse por los mecanismos de neurorreparación derivados de la plasticidad neuronal. Aún con esto, la recuperación funcional es mayor o menor según las características del propio ictus (tamaño y topografía de la lesión) (Duncan et al., 1992; Calautti and Baron, 2003).

Por ello, tras realizar un modelo de isquemia, es necesario evaluar un test de comportamiento para comprobar el estado y la recuperación funcional de los animales. El modelo de infarto por la ligadura de la MCA afecta principalmente a la corteza frontoparietal motora, llegándose a extenderse hasta la corteza sensorial del ratón (Avendano et al., 1995; Chi-Hua Chen et al., 2011; Dennis D.M.O'Leary et al., 2007). (Figura 1.7)

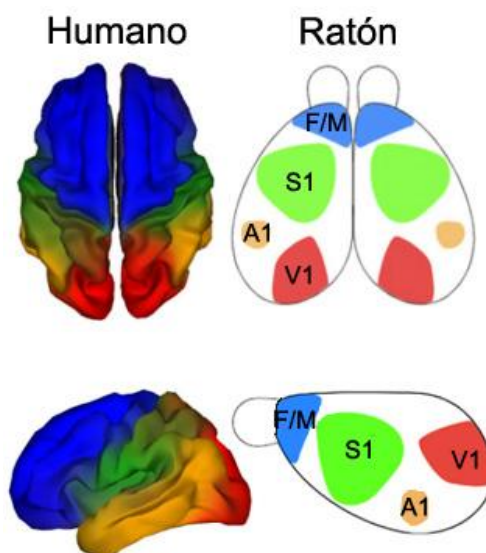


Figura 1.7. Esquema de la función de diferentes áreas del cerebro de ratón, comparando con las áreas en un cerebro humano. F/M: Corteza frontal-motora; S1: Corteza sensorial; A1: Corteza Auditiva; V1: Corteza visual. Modificado de Chi-Hua Chen et al., 2011 y O’Leray D et al., 2007

En la actualidad, existen pruebas para valorar el comportamiento motor, sensorial y cognitivo tras la isquemia cerebral, pero éstas dependen de la subjetividad del investigador al determinar la puntuación en cada prueba (García-Bonilla et al., 2011)

1.2. ÓXIDO NÍTRICO

El descubrimiento del Óxido Nítrico (NO) comienza en el año 1980, cuando Furchgott y Zawadzki observan que la relajación de la fibra muscular lisa de la pared vascular causa vasodilatación. Pero esta respuesta no es producida directamente por acetilcolina, sino que promueve la liberación de otra sustancia, que entonces no son capaces de aislar ni identificar, pero que denominan factor relajante de endotelio (EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980). Varios años después, en los años 1986 y 1987, laboratorios independientes, liderados por Ignarro en la Universidad de Los Ángeles, por Furchgott en la Universidad de Nueva York y por Salvador Moncada en los Laboratorios Wellcome Research de Inglaterra, llegan a la conclusión que el EDRF comparte muchas características con el Óxido Nítrico (Furchgott et al., 1987; Ignarro et al., 1987), y que la liberación de este compuesto por parte de NOS es la causante de la actividad biológica del EDRF (Palmer et al., 1987; Palmer et al., 1988). Estos descubrimientos hacen que las investigaciones y publicaciones sobre el NO aumenten considerablemente, lo que lleva a la revista *Science* a nombrar esta molécula como la

“molécula del año” en 1992. De igual manera, en 1998, la Academia Sueca concede el premio Nobel en Fisiología y Medicina a los investigadores R.F. Furchgott, L.J. Ignarro y F. Murad por sus descubrimientos en relación con el NO como molécula de señalización en el sistema cardiovascular.

El NO es un mensajero químico especial, con características distintas al resto de neurotransmisores o neuromoduladores. Es un gas, con una vida media de 3-6 segundos. Es capaz de difundir libremente a través de las membranas celulares por afinidad lipofílica sin requerir ningún tipo de transportador ni receptor de membrana. No es almacenado en vesículas. No se metaboliza por enzimas específicas, sino que es degradado espontáneamente por oxidación o por compuestos como el superóxido o la oxihemoglobina (Yun et al., 1997; Ignarro et al., 1989; Tzeng and Fung, 1992; Rodrigo et al., 2000).

Entre las funciones fisiológicas del NO destacan la regulación del flujo vascular, incremento del flujo sanguíneo durante la hipercapnia, participación en mecanismos de defensa cerebral a través de la microglía, activación de fibras parasimpáticas que inervan los vasos cerebrales, participación en procesos de plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria (Rodrigo et al., 2000; Irikura et al., 1994; Wood et al., 1994). Además, el NO participa en otros procesos biológicos como activación de factores de transcripción, apoptosis, transporte de electrones mitocondriales, adhesión de plaquetas y neutrófilos, contracción de estómago, intestino, útero y corazón, erección del pene, producción de células T, regulación del sueño y en la presión sanguínea (Jarvinen et al., 1999; Rodrigo et al., 1997; Rodrigo et al., 1994).

1.2.1. Síntesis. Óxido Nítrico Sintetas

Experimentos realizados por el equipo del profesor Moncada en células endoteliales, demuestran que el aminoácido L-arginina es el precursor de la síntesis de NO (Moncada et al., 1989). La L-arginina, implicada en el ciclo de la urea, se transforma en L-citrulina produciéndose Óxido Nítrico equimolarmente, en una reacción catalizada por la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS) (Schmidt et al., 1988).

Para la síntesis del NO, se requiere la presencia de los siguientes cofactores: calmodulina, flavín mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida (NADPH) y grupo Hemo. Para producir 1 mol de NO intervienen 5 electrones del

nitrógeno guanidino de la L-arginina, 1,5 moles de NADPH y 2 de dioxígeno. La reacción consiste en dos actos separados de monooxigenación. La primera parte consiste en la incorporación de un átomo de O_2 al sustrato, a la vez que otro átomo se reduce hasta agua, obteniéndose la N-hidroxi-L-arginina (NOH-L-Arg) como producto intermedio. La segunda parte cuenta con que un electrón de la NADPH, otro de la NOH-L-Arg y el O_2 en forma de dioxígeno-hierro atacan al carbono guanidino de la NOH-L-Arg, facilitando la incorporación de O_2 y la escisión de enlace C-N, liberando un átomo de nitrógeno y dando lugar a L-citrulina. Además, en esta segunda reacción un átomo de O_2 se reduce hasta agua y otro se une al nitrógeno para formar el NO (Rodrigo et al., 2000). (Figura 1.8)

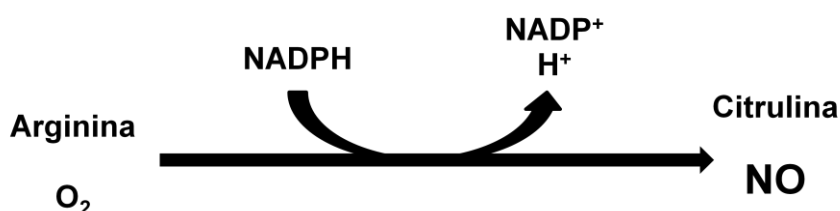


Figura 1.8. Esquema de la síntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina. Modificado de Alderton WK, 2001

Una de las moléculas diana del NO es la guanilato ciclasa que tras su activación convierte el guanosintrifosfato cíclico (GTPc) en guanosinmonofosfato cíclico (GMPc). La producción de GMPc condiciona la entrada de sodio y potasio a través de los canales de calcio, originando la relajación del músculo vascular liso de las arteriolas y arterias (Ignarro, 1990). Al disponer de un electrón libre no apareado, el NO es considerado como un radical libre altamente reactivo con diferentes moléculas como los radicales superóxido, las hemoproteínas, los grupos tiol y amino, así como con el oxígeno, por lo que participa en diferentes mecanismos de señalización regulando la actividad de diversas proteínas y la expresión de genes. Por ello, su actividad puede detectarse fundamentalmente a través de sus metabolitos: los nitritos y nitratos (Lowenstein and Snyder, 1992).

Puesto que el Óxido Nítrico no es almacenado en vesículas, la regulación del sistema NOS es muy importante. Por el momento, se han descubierto tres isoformas cuya nomenclatura sigue las normas propuestas en la XIV Reunión Internacional sobre la Nomenclatura Farmacológica del NO y compuestos relacionados (Moncada et al., 1997). Las isoformas endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS) forman parte de las NOS constitutivas dependientes de calcio, mientras que la isoforma inducible (iNOS) es independiente de calcio (Forstermann et al., 1991).

La NOS es una oxidorreductasa (Martinez-Rodriguez and Martinez-Murillo, 1984) que contiene un grupo hemo y un lugar de unión a la calmodulina (proteína fijadora de calcio) y que presenta dos dominios catalíticos (Richards and Marletta, 1994; Ghosh et al., 1995; McMillan and Masters, 1995) (Figura 1.9):

- Uno de actividad reductasa, que está ubicado en la mitad C-terminal de la enzima, análogo al citocromo P450 y, que presenta los sitios de unión para los cofactores NADPH, flavín adenín dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN).

- Otro de actividad oxidasa, que está compuesto por el grupo hemo ubicado en la mitad N-terminal de la proteína y que determina la oxidación de la L-arginina. Presenta, además, un sitio de unión para otro cofactor, la tetrahidrobiopterina (BH_4).

La unión de la calmodulina a la NOS permite el flujo de electrones desde el dominio reductasa al grupo hemo, actuando como “interruptor molecular” y posibilitando la síntesis de NO desde L-arginina. Por un lado, las isoformas constitutivas permanecen inactivas hasta que se produce un aumento de Ca^{2+} intracelular. Al unirse la calmodulina a la enzima, los electrones donados por el NADPH fluyen desde el dominio reductasa hacia el dominio oxigenasa y son aceptados por el citocromo C. Por otro lado, en la isoforma inducible, aún a bajas concentraciones Ca^{2+} , la calmodulina permanece fuertemente unida, actuando como una subunidad más. En este caso, los electrones donados por el NADPH son transportados por el FAD y por FMN hacia el grupo hemo (Kelly et al., 1996).

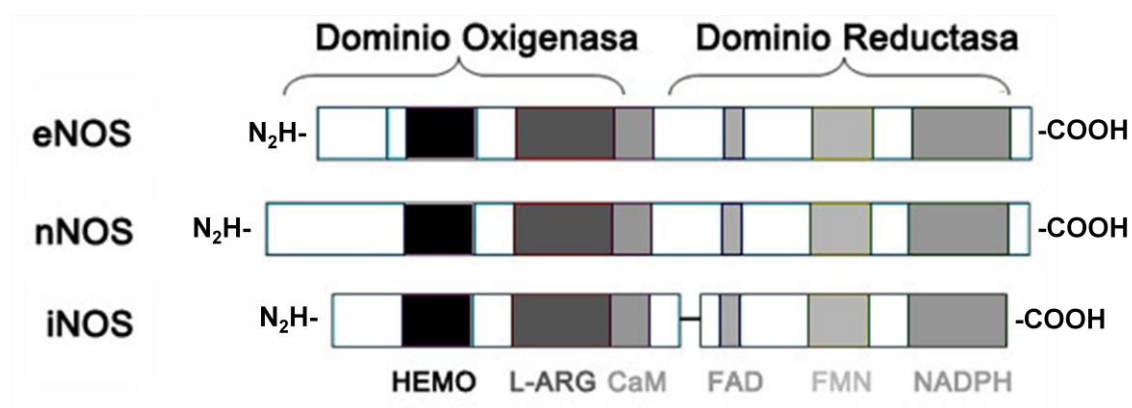


Figura 1.9. Esquema de las 3 isoformas de NOS (eNOS, nNOS e iNOS) y sus dominios reductasa y oxigenasa. Modificado de Hobbs AJ et al., 1999.

Óxido Nítrico Sintasa endotelial

La isoforma endotelial (eNOS), con un peso de 135 kDa, (Pollock et al., 1991) también es conocida bajo las abreviaturas NOS tipo III, NOS-3, y ecNOS. El gen de esta isoforma, con una extensión de 21-22 Kb (con 26 exones, que codifican para 1203 aminoácidos), corresponde al cromosoma 7 (Xu et al., 1994).

Esta isoforma está presente mayoritariamente en las células endoteliales de la pared de los vasos (Moncada et al., 1991; Myers et al., 1990) y tiene un sitio de miristilación con capacidad para unirse a un ácido graso. Esto le permite estar asociada a la membrana lipídica de las células, lo que le diferencia de las otras dos isoformas (nNOS e iNOS) que son hidrosolubles y se encuentran libres en el citoplasma. Posiblemente, esta asociación a la membrana facilite que el NO sintetizado esté más cerca del exterior celular y pueda difundir más rápidamente hacia la sangre o músculo liso adyacente. Además, se ha comprobado que la eNOS puede encontrarse en el aparato de Golgi y en el citosol, aunque en esta última localización sea donde menos concentración de NO es capaz de sintetizar (Church and Fulton, 2006; Zhang et al., 2006).

Se ha comprobado que en células endoteliales, estimuladas por el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o sometidas a estrés elevado, la proteína quinasa B (Akt) fosforila la eNOS en la posición Serina-1177 incrementando su actividad (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). La activación de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) permite la fosforilación de la fosfatidil inositol 3-4 bifosfato de membrana, que recluta Akt en la membrana celular permitiendo a su vez la fosforilación y activación. Una vez activado Akt se promueve la fosforilación de eNOS en su posición Ser-1177 (Roviezzo et al., 2007).

Además, la bradiquinina estimula la calmodulina dependiente de la quinasa II que también fosforila la Serina-1177 (Fleming et al., 2001). Hay diferentes puntos de fosforilación que tienen un papel importante en la activación de eNOS, en la serina están S116, S617, S635, S1177 (Church and Fulton, 2006; Fulton et al., 2005; Sessa, 2004); en la treonina la T497 (Duran and Dillon, 1990) y en la tirosina la Tyr83 (Fulton et al., 2005).

Esta isoforma, junto con la neuronal, produce NO en bajas cantidades para actuar como señalizador molecular, produciendo vasodilatación (Forstermann et al., 1994).

Óxido Nítrico Sintasa neuronal

La isoforma neuronal (nNOS) también es conocida como NOS tipo I, NOS-1, bNOS, y ncNOS. Su gen tiene 160 Kb con 29 exones que codifican para 1.433 aminoácidos aparece localizado en el cromosoma humano número 12 (12q 24.2) (Xu et al., 1993). Ha sido descrita como un monómero inactivo de 150 kDa, mostrando una homología con la citocromo P450 reductasa (Bredt et al., 1991) o también como un homodímero soluble y activo de 155 kDa (Schmidt and Murad, 1991). Para la dimerización necesita BH_4 , grupo hemo y la unión de L-arginina (Reif et al., 1999).

Al igual que con la eNOS, la fosforilación de nNOS es importante para su activación. Ésta aumenta su actividad, mientras la defosforilación la reduce (Gorren et al., 1996). Esto es regulado por algunas quinasas y fosfatasas como Proteín quinasa A (PKA), calmodulinas dependientes de quinasa, Proteín quinasa C (PKC) o la fosfatasa 1, que a su vez son reguladas por señales tanto intra como extracelulares (Sullivan et al., 1997). Sin embargo, el lugar de fosforilación de nNOS es importante ya que afectará a su actividad. Así es que protein quinasa CAMKII fosforila en la Serina-847, inhibiendo la unión de Ca^{2+} a la calmodulina y reduciendo su actividad, actividad que se ve aumentada por la acción de la fosfatasa 1, que disminuye esta fosforilación en Serina 847 (Grenert et al., 1997). Otro punto de fosforilación es en la Serina-1412, análogo al punto en que Akt fosforila a eNOS (Smith et al., 1995).

Esta isoforma se localiza principalmente en el citosol de las células nerviosas tanto de cerebro, medula espinal y sistema nervioso periférico. Existen altas concentraciones de nNOS en cerebelo, hipotálamo, estriado e hipocampo (Forstermann et al., 1990). Al igual que la isoforma eNOS, en condiciones fisiológicas produce bajas cantidades de NO en las neuronas, con función neurotransmisora (Forstermann et al., 1994).

Óxido Nítrico Sintasa inducible

La isoforma inducible (iNOS) también es conocida con las abreviaturas NOS tipo II, NOS-2, macNOS, y hepNOS. El gen de esta isoforma de 37 Kb con 26 exones que codifican para 1153 aminoácidos, se localiza en el cromosoma 17, estando situados en este caso los genes a cada lado del centrómero (17cen-17q 11.2) (Xu et al., 1994).

Se localiza en el citosol de los macrófagos activados de ratón con una conformación dimérica y un peso molecular de 135 kDa (Hevel et al., 1991), y en las plaquetas humanas con un peso molecular de 200 kDa (Chen and Mehta, 1996). También se encuentra en hepatocitos, células tumorales, neutrófilos, linfocitos, así como en astrocitos (Gibson et al., 2005; Moncada et al., 1991; Wright et al., 1989). Incluso puede expresarse en neuronas sometidas a hipoxia (Moro et al., 1998).

Su expresión difiere de la de las isoformas constitutivas. Es inducida generalmente por estímulos intensos tales como las endotoxinas o las citoquinas inflamatorias, como el interferón-gamma (INF- γ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o la interleuquina-1 (IL-1); o por señales de activación como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Salter et al., 1991). En estos casos no se requiere el incremento en la concentración intracelular del Ca^{2+} . Aunque la isoforma iNOS necesita también calmodulina, no depende de forma estricta de las concentraciones de calcio, debido a que la calmodulina está fuertemente unida a ella a niveles basales de calcio intracelular (Lowenstein et al., 1994).

Esta isoforma cataliza la síntesis de altas concentraciones de NO y por periodos prolongados, destruyendo bacterias y parásitos. El NO producido actúa como un radical libre, siendo citotóxico para ciertos microorganismos y células tumorales. Puede oxidar grupos sulfhidrilos de las proteínas con el consiguiente agotamiento del glutatión citosólico y puede reaccionar con el anión superóxido para formar dióxido de nitrógeno, el cual resulta ser fuertemente oxidante y un radical hidroxilo (Provost et al., 2010; Pryor and Squadrito, 1995; Ischiropoulos et al., 1992).

En la siguiente tabla se resumen las características de cada isoforma de la NOS (Tabla 1.2).

ISOFORMA	NOMENCLATURA	PM	LOCALIZACIÓN	REGULACIÓN/ ACTIVIDAD
Endotelial	eNOS NOS tipo III, NOS-3 ecNOS	135KDa	Principalmente en membrana células endoteliales, plaquetas y cerebro	Dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina Libera picomoles de NO Liberación corta
Neuronal	nNOS NOS tipo I, NOS-1, bNOS, ncNOS	150KDa inactiva 155KDa activa	Citosólica Cerebro, glándula adrenal, plaquetas y pulmón	Dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina Libera picomoles de NO Liberación corta-media
Inducible	iNOS NOS tipo II, NOS-2, macNOS, hepNOS.	135KDa	Citosólica Macrófagos. Astrocitos, microglía y neuronas	Independiente de Ca^{2+} /Calmodulina Libera nanomoles de NO Liberación prolongada (DAÑO CELULAR)

Tabla 1.2. Resumen de las principales características de las isoformas de NOS: eNOS, nNOS, iNOS

1.2.2. Óxido Nítrico en la Isquemia Cerebral

El Óxido Nítrico es considerado un importante neurotransmisor involucrado en la fisiopatología de muchas enfermedades neurológicas. Por un lado, altos niveles de sus metabolitos en plasma pueden provocar depresión (Ashish Dhir and S.K.Kulkarni, 2011). Por otro lado, bajas concentraciones de NO están implicadas en el desarrollo de enfermedades cerebrovasculares (Claudio Napoli and Louis J. Ignarro, 2009)

En la isquemia cerebral, los niveles de NO también tienen un papel importante, por un lado tienen efectos protectores y por otro, efectos dañinos. Esto depende del momento, la duración de liberación, de la isoforma y de la célula por la que se sintetiza. Así, se produce un aumento de NO inmediatamente después del ictus por parte de la isoforma eNOS que promueve la vasodilatación e inhibe la adhesión y la agregación microvascular, teniendo un papel protector. Sin embargo, después de que

la isquemia se desarrolle, el aumento prolongado y exacerbado de NO se debe a las isoformas nNOS e iNOS, lo que contribuye al daño cerebral (Rodrigo et al., 2000).

Como ya se ha explicado anteriormente, la eNOS tiene un papel importante en el mantenimiento de la perfusión tisular y es sobrerregulado tras la isquemia (Zhang and Iadecola, 1993; Huang et al., 1994). Esta isoforma se activa minutos después del ictus, provocando un aumento de NO durante un corto espacio de tiempo (Wei et al., 1999; Veltkamp et al., 2002).

La activación de eNOS se debe principalmente al aumento intracelular de Ca^{2+} que ocurre durante la cascada isquémica. Este Ca^{2+} se une a la calmodulina activando esta isoforma que mayoritariamente se encuentra en la membrana celular. Las caveolinas (proteínas integrales de membrana plasmática presentes en las caveolas) y la calmodulina se someten a una asociación y disociación de eNOS con la membrana caveolar dependiente de Ca^{2+} . Las caveolinas inhiben la actividad de eNOS, mientras la calmodulina la estimula. Otras proteínas caveolares parecen contribuir al complejo eNOS-membrana, entre las que destacan la bradiquinina B2 o la chaperona Hsp90. Cuando los niveles de Ca^{2+} vuelven a niveles basales, la calmodulina se libera y la enzima vuelve a un estado inactivo al reasociarse eNOS con las caveolinas (Michel et al., 1997; Feron et al., 1998). La exposición de las células endoteliales a bradiquinina B2 promueve la disociación de eNOS de las caveolinas translocándose al citosol y dependiendo de los niveles de Ca^{2+} (Prabhakar et al., 1998).

Otra asociación de la eNOS con proteínas está representada por Hsp90 (heat shock protein 90) que es una proteína de choque térmico, esencial y abundante en todas las células eucarióticas. Entre sus funciones está la de proporcionar estabilidad y mantener activas muchas proteínas esenciales para la célula, como las implicadas en transducción de señales o ciclo celular. Hsp90 puede formar complejo con eNOS en solución actuando como un modulador alostérico, induciendo un cambio conformacional en la misma o estabilizando la forma dimérica de la isoforma manteniéndola activa (Garcia-Cardena et al., 1998). Los factores de crecimiento y las respuestas al estrés estimulan de manera dosis dependiente esta asociación de Hsp90 con eNOS, aumentando los niveles de NO en los vasos sanguíneos (Sessa, 1994; Davies, 1995).

Otra manera de activar eNOS es la fosforilación de la misma en distintas serinas o tirosinas (ya visto anteriormente) por quinasas (Fulton et al., 1999). La fosforilación por

Akt (proteín quinasa B) en la posición Serina 1177 de eNOS permite mejorar la actividad de esta isoforma aumentando los niveles de NO. Además, se ha comprobado que una mutación en ese lugar por una alanina, evita la fosforilación por Akt y con ello la producción de NO (Dimmeler et al., 1999). Además, esta quinasa no activa la forma no acilada de eNOS, lo que indica que es necesaria la compartimentación de ambas proteínas en la membrana para su interacción funcional (Downward, 1998). Akt está implicado en la ruta fosfatidil-inositol quinasa 3 (PI3K)/Akt, que es una ruta de señalización importante para la supervivencia celular y que está involucrada en la protección frente a procesos de estrés y modulada por diferentes elementos de la cascada apoptótica (Scheid and Woodgett, 2001; Toth et al., 2003). Esta proteína quinasa B además es específica de la fosforilación de eNOS, mediante experimentos se ha demostrado que su cotransfección con nNOS o iNOS no aumenta los niveles de NO (Fulton et al., 1999). (Figura 1.10)

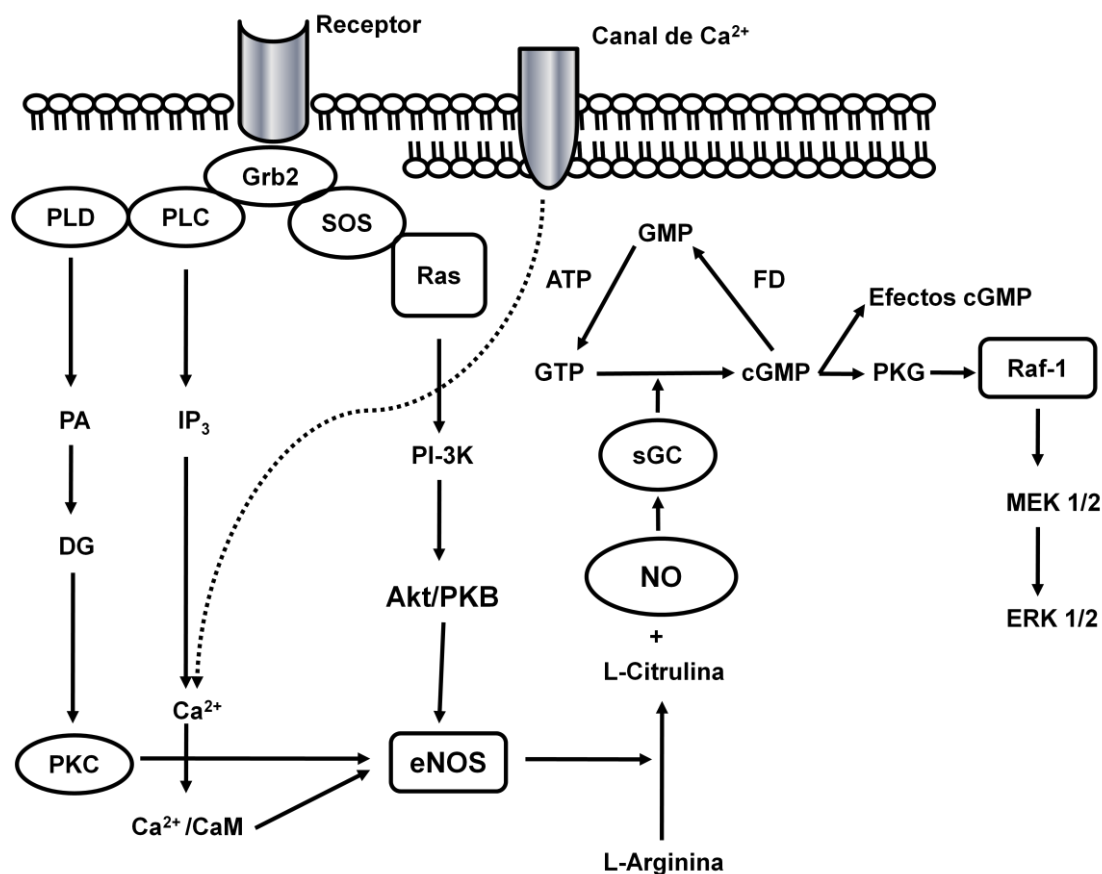


Figura 1.10. Esquema de la activación de eNOS por la ruta de señalización proinflamatoria. Se produce el aumento de Ca^{2+}_i y la activación de Akt/PKB y ERK1/2 que provoca cambios en la fosforilación de eNOS, elevando los niveles de NO y con ello la permeabilidad de la barrera microvascular. Modificado de Duran WM et al (1990) y de E. Salas et al (2006).

La producción de NO por parte de la eNOS tiene principalmente como diana la célula muscular lisa que forma la pared vascular. El NO que difunde a través de las membranas celulares estimula la guanilato ciclasa soluble al unirse a su grupo hemo. Esta unión lleva a un desplazamiento alostérico de grupos histidina y con ello a un cambio conformacional de la enzima, que se activa para catalizar la síntesis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Michel, 1999). Las células de la pared vascular contienen una fosfodiesterasa V específica para cGMP. Esto activa una proteína quinasa que lleva a cabo la extrusión de Ca^{2+} desde el citoplasma por las bombas de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPasa provocando la relajación muscular y con ello la vasodilatación, regulando el flujo y la presión sanguínea (Dusting, 1995; Furchgott, 1990). Por tanto, la liberación de NO por parte de eNOS es considerado beneficioso tras un ataque isquémico.

Se ha comprobado que ratones transgénicos deficientes en eNOS muestran volúmenes de infarto mayores a los controles al ocluir la MCA (Huang et al., 1996). El NO producido por esta isoforma no sólo modula la integridad del endotelio sino que también muestra actividad antiinflamatoria y antiapoptótica (Li and Forstermann, 2000). Además de esto, tiene efectos beneficiosos en el mantenimiento del FSC, inhibición de la agregación plaquetaria y reducción de la adhesión leucocitaria (Cirino et al., 2003).

El aumento de Ca^{2+} intracelular, derivado de la excitotoxicidad por glutamato, también lleva a la activación de la nNOS. En condiciones fisiológicas, nNOS está activa constitutivamente produciendo NO en bajas concentraciones. Esta isoforma tiene efectos beneficiosos en procesos relacionados con la plasticidad neuronal (Zhang et al., 1993a), neurotransmisión o neuromodulación (Dawson and Dawson, 1996b; Zhou and Zhu, 2009). Esta actividad neuroprotectora por parte de nNOS tiene un papel importante en el hipocampo (Arancio et al., 1996) y el cerebelo principalmente (Boxall and Garthwaite, 1996; Zhou and Zhu, 2009).

Tras un ataque isquémico, el NO derivado de nNOS en neuronas es una de las mayores fuentes de neurotoxicidad en la isquemia, al aumentar su concentración y durante mayores espacios de tiempo (Eliasson et al., 1999). Al igual que eNOS, esta isoforma es regulada por caveolinas (caveolina 3) y Hsp90. Esta chaperona actúa facilitando la unión del grupo hemo (Bender et al., 1999) o manteniendo la unión de la calmodulina a nNOS (Song et al., 2001). Se ha detectado la formación de complejos nNOS-Hsp90 que pueden estar incrementando los niveles de producción de NO

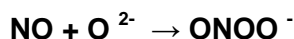
(Bender et al., 1999). Estudios con ratones *knockout* para nNOS muestran tamaños de infarto menores tras una isquemia focal permanente o temporal, que sus *wild-types*, confirmando el daño neuronal que produce la sobreactivación de esta isoforma (Huang et al., 1994).

Por otro lado, el daño isquémico está asociado a una respuesta inflamatoria, como ya se ha explicado. Se produce el aumento de la activación microglial y astrogial (Feuerstein et al., 1997) y la entrada de leucocitos en el parénquima cerebral. Diferentes mediadores como citoquinas proinflamatorias o moléculas de adhesión son liberadas y se activan importantes factores de transcripción como factor de necrosis tumoral (TNF α), factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) e interleuquina 1 (Dirnagl et al., 1999). Las citoquinas activan la expresión de genes relacionados con la inflamación como COX-2 o la isoforma inducible de NOS (del Zoppo et al., 2000).

Tras un accidente isquémico el TNF- α es expresado rápidamente (Liu et al., 1994) involucrando la activación de iNOS (Simmons and Murphy, 1992), que es independiente de los niveles de Ca²⁺. Esta activación ocurre después de que se hayan activado eNOS y nNOS, y la producción de NO se ve incrementada y mantenida en el tiempo. Del mismo modo que ocurre en roedores *knockout* para nNOS, ratones carentes de iNOS muestran infartos menores que sus *wild-types*, lo que demuestra que la sobre-expresión de NO por parte de esta isoforma también contribuye al daño cerebral (Iadecola et al., 1997).

El incremento de la síntesis de NO por parte de nNOS e iNOS tiene una gran importancia fisiopatológica en los cuadros clínicos de la isquemia, este incremento conlleva consecuencias neurológicas e incapacidades graves. Por un lado, la similitud del NO con la molécula de oxígeno, hace que muchas proteínas como la hemoglobina, mioglobina, citocromo oxidasa, peroxidasa o el citocromo P450 que se unen al O₂ como una parte integral de su función, tengan al NO como diana (Rodrigo et al., 2000). Por otro lado, el NO está involucrado en mecanismos citotóxicos independientes de GMPc, como son la formación de radicales libres o nitrosilación de ácidos nucleicos (Gross and Wolin, 1995).

El NO es capaz de interactuar con el anión superóxido para formar peroxinitrito.



El peroxinitrito es altamente oxidativo, capaz de oxidar tioles y bases de ADN, y de nitrar directamente o a través de otras especies reactivas de nitrógeno los residuos de tirosina de las proteínas impidiendo interacciones funcionales de estos residuos, amenazando así la viabilidad celular (Beckman, 1996). En presencia de ciertos metales, el peroxinitrito permite formar especies NO^{2+} que pueden nitrar compuestos fenólicos, incluyendo los anillos aromáticos de las proteínas (Ischiropoulos et al., 1992; Beckman et al., 1992). Además, el ácido peroxinitroso (ONOOH , conjugado del ácido peroxinitrito) es altamente reactivo (Pryor and Squadrito, 1995). Así, su ruptura genera el radical libre de dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}^2$) que contribuye con la toxicidad del ONOOH (Zhu et al., 1992). Finalmente, la nitración de proteínas disminuye su actividad catalítica, así como su susceptibilidad para su digestión (Berlett et al., 1996; Gow et al., 1996).

En resumen, en el ataque isquémico tienen lugar los siguientes fenómenos (Figura 1.11):

- Aumento a los pocos minutos de producirse el ictus de la actividad y expresión de eNOS, como intento de regular y compensar el flujo sanguíneo por medio de la vasodilatación (Zhang et al., 1993b).
- Aumento más tardío de la actividad y expresión de nNOS, incrementando la concentración de NO a medio plazo al daño isquémico en el cerebro (Lamas et al., 1998).
- Aumento tras varias horas de iniciarse el ataque isquémico de la actividad y expresión de iNOS, produciendo niveles elevados de NO que contribuyen al progreso de la neuropatología (Moro et al., 1998).

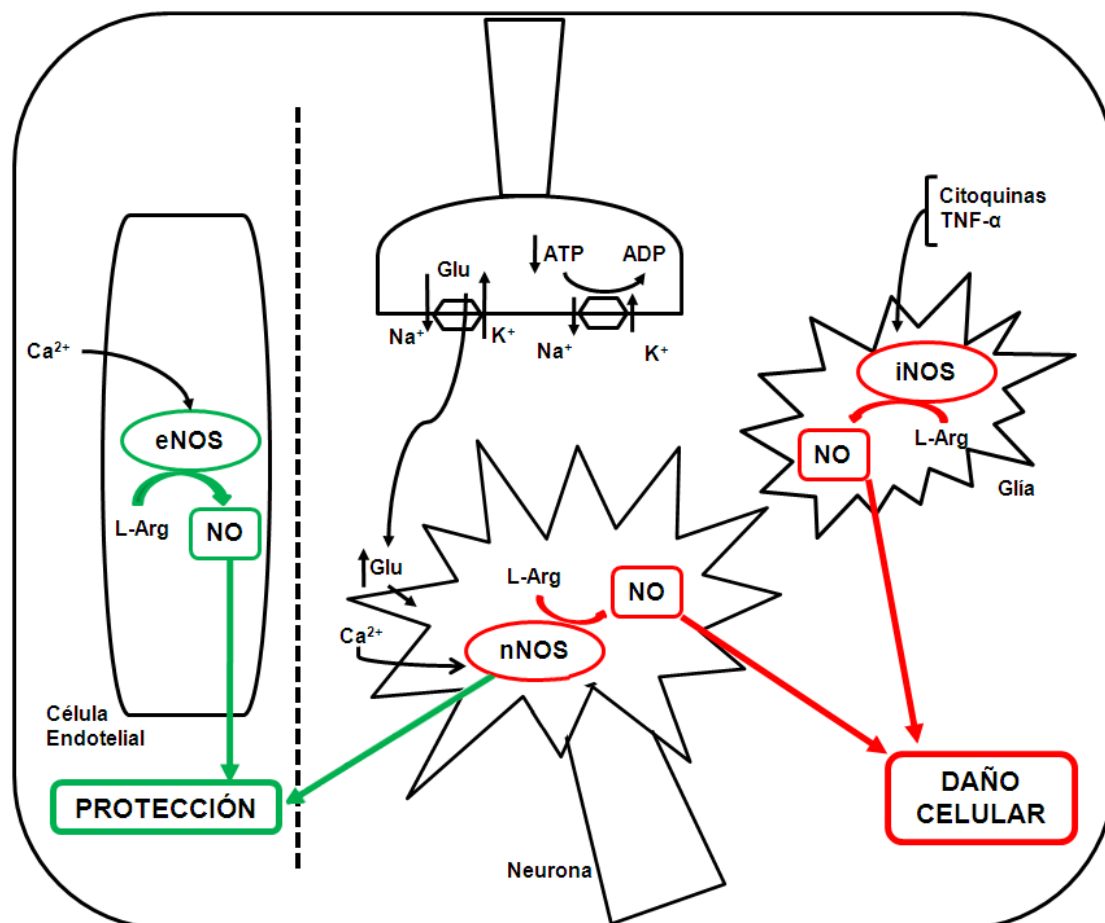


Figura 1.11. Esquema de las funciones del NO sintetizado por las distintas isoformas de NOS. Modificado de Moro MA, et al., (2004).

1.2.3. Regulación de los Niveles de NO como Tratamiento de la Isquemia Cerebral.

Desde que en 1996 se aprobara el activador tisular de plasminógeno recombinante (r-tPA) no se ha aprobado ninguna otra terapia frente a la isquemia cerebral. El r-tPA provoca la lisis del coágulo que está ocluyendo la arteria intracraneal. Se administra en dosis de 0,9 mg/kg en una corta ventana de tiempo desde que comienzan los síntomas del ataque isquémico (máximo de 3 a 4,5 horas, fase hiperaguda), lo que es un factor limitante. Además, no es efectivo en todos los pacientes, se ha visto que puede incrementar el riesgo de disfunción de la barrera hematoencefálica y la transformación hemorrágica, con lo que sólo se pueden beneficiar de este tratamiento menos del 5% de los pacientes (Neumann-Haefelin et al., 2002; Castellanos et al., 2007; Yang and Rosenberg, 2011; Lloyd-Jones et al., 2010). Por otro lado, la generación de nuevas drogas neuroprotectoras dirigidas hacia una regulación de los componentes de la cascada isquémica constituye una línea de investigación prioritaria

(Rodriguez-Gonzalez et al., 2011b). Medicamentos que bloqueen los distintos eventos perniciosos de la cascada isquémica y a la vez incrementen a muy corto plazo la reperusión en la zona isquémica deberían ser los neuroprotectores ideales.

El conocimiento de los pasos de la cascada isquémica, inflamatoria y apoptótica que se desencadenan tras la isquemia, sirven de referencia para la síntesis de nuevos fármacos que frenen o eviten los daños neurológicos que se desarrollan en esta patología. La administración temprana (***“Tiempo es Cerebro”***) (Saver, 2006; Gomez C., 1993) y la combinación de distintas estrategias es la tendencia actual para el tratamiento del ictus.

La magnitud y duración de la síntesis de NO por las células determina que su acción sea fisiológica o patológica. El NO producido por eNOS reduce la apoptosis y confiere protección contra el infarto cerebral, mientras que concentraciones patológicas de NO producidas por iNOS inducen apoptosis y son neurotóxicas (Dimmeler et al., 1997; Rossig et al., 2000) lo que ocurre en determinados estados tales como inflamación crónica (Seo et al., 1995; Kubes et al., 1991), shock séptico (Crossin, 1991) o isquemia cerebral (Alonso et al., 2002; Rodrigo et al., 2004). A continuación, se describen algunos de los tratamientos que regulan de forma indirecta los niveles de NO tras un ictus:

- **Estatinas:** Cuyas características son aumentar el flujo sanguíneo al incrementar la expresión de eNOS. Son capaces de inhibir la expresión de iNOS (Vaughan and Delanty, 1999) al atenuar la respuesta inflamatoria de las citoquinas. Poseen propiedades antioxidantes, disminuyendo el estrés oxidativo en el cerebro (Vaughan and Delanty, 1999) lo que lleva a la reducción del volumen del infarto. Finalmente, mejoran la función neurológica, al inducir angiogénesis, neurogénesis y sinaptogénesis, contribuyendo al efecto neuroprotector (Chen et al., 2003a). A pesar de todos estos efectos beneficiosos, son necesarios aún más ensayos clínicos para abordar el papel de la terapia con estatinas en la prevención del ictus.
- **Aspirina:** Con conocidos efectos antiinflamatorios y antiplaquetarios a través de la vía dependiente de COX, puede disminuir los volúmenes del infarto (Grotta et al., 1985; Carolei et al., 1986). Sin embargo, hay estudios que demuestran que para que estos beneficios sean posibles, es necesaria la administración de altas dosis para disminuir el estrés oxidativo o la inhibición

de factores de transcripción como NF κ - β (Grilli et al., 1996). Por otro lado, un tratamiento crónico a bajas dosis, en pacientes que ya hayan sufrido un infarto cerebral puede ser útil por sus propiedades antitrombóticas y sus efectos neuroprotectores.

Además, se están desarrollando estrategias farmacológicas para el tratamiento del ictus dirigidas al sistema NOS como diana. El objetivo va dirigido no sólo a la inhibición de la actividad de la iNOS (Willmot et al., 2005a), sino también a potenciar la síntesis de NO a través de la enzima eNOS (Miller and Megson, 2007) mediante la utilización de donadores de NO que actúen a través de esta enzima. Entre los tratamientos que se han propuesto para regular los niveles de NO actuando directamente sobre el sistema de las NOS son:

- Aumentar los niveles iniciales de NO:
 - Mediante la administración de L-arginina y/o cofactores de la síntesis de NO.
 - Mediante donadores o liberadores directos de NO. Los donadores de NO son drogas que producen NO generalmente por mecanismos independientes de NOS. Los más comunes son nitratos orgánicos, nitroprusiato de sodio, S-nitrotioles y donadores híbridos (Willmot and Bath, 2003). La administración de L-arginina o de estos donadores directos de NO, tiene que darse en los 30 minutos siguientes al inicio del ataque isquémico. Entonces se reduce el volumen del infarto y se mejora el flujo sanguíneo en el área de penumbra (Salom et al., 2000; Willmot et al., 2005b). Estos efectos pueden ser mediados en parte a través de los efectos beneficiosos del FSC en áreas de perfusión comprometida (área de penumbra) (Rashid et al., 2003). Sin embargo, estos efectos protectores se pierden cuando los fármacos se administran pasado este espacio temporal. Aún así, estos donadores pueden inducir neurogénesis si se administran como un tratamiento crónico tras un infarto cerebral (Zhang et al., 2001).
 - Liberando la eNOS de la membrana caveolar, para que sea soluble en el citosol, donde muestra más actividad.

-Mediante la activación de eNOS por la ruta de Akt independiente de Ca^{2+} . La ruta PI3K/Akt es una importante ruta de supervivencia, involucrada en la protección frente a procesos de estrés y capaz de modular elementos involucrados en la apoptosis (Toth et al., 2003; Scheid and Woodgett, 2001). Además, la activación de la señalización por PI3K/Akt/eNOS parece jugar un papel clave en la protección por preconditionamiento, promoviendo la supervivencia celular (Zhang et al., 2007b) y protegiendo la barrera hematoencefálica, posiblemente mediante la actuación de células gliales (Gesuite et al., 2011). Estudios recientes han demostrado que la activación aguda de la protein quinasa B (Akt) es cardioprotectora y reduce la disfunción causada por el daño isquémico (Ackah et al., 2005; O'Neill and Abel, 2005).

- Disminuyendo los niveles tardíos de NO:

-Inhibiendo la expresión de la NOS mediante glucocorticoides (Áras-Lopez et al., 2009).

-Inhibiendo la disponibilidad de cofactores mediante inhibidores de la síntesis de BH_4 (Mayer and Werner, 1995; Bommel et al., 1998).

-Destruyendo el NO presente en el sistema circulatorio mediante hemoglobina.

-Inhibiendo la actividad de la NOS. La mayoría de los compuestos dirigidos a la inhibición de la actividad de las NOS identificados hasta el momento presentan una inhibición competitiva con el sitio de unión de la L-arginina (Nason et al., 2004; Hagmann et al., 2000). Se trata de compuestos con semejanza estructural con él. Estudios sobre la topología del sitio activo de las NOS, que revelan la enorme similitud que existe entre ellas, convierten en un auténtico desafío el diseño de inhibidores selectivos capaces de discernir entre las tres isoformas. El primer compuesto con estas características en ser identificado fue un derivado metilado simple de dicho aminoácido, la L-NG-monometil arginina (L-NMMA), el cual fue inicialmente utilizado en estudios de acciones citotóxicas de macrófagos activados, antes de que se descubriera que el NO participa en dicho proceso (Hobbs et al., 1999). Desde entonces, son muchos los inhibidores descritos hasta la fecha

en la bibliografía, cada uno de ellos con diferentes grados de potencia y selectividad (Salerno et al., 2002; Proskuryakov et al., 2005).

-Mediante la inhibición de la actividad de nNOS: Podrían ser beneficiosos en etapas tempranas de la isquemia. Sin embargo, actualmente, no hay evidencias suficientes de ensayos clínicos sobre los efectos de este tipo de inhibidores, en pacientes que hayan sufrido un ictus agudo (Bath et al., 2002).

-Mediante la inhibición de la actividad de iNOS: El uso de inhibidores selectivos de esta isoforma, tiene un alto valor como estrategia terapéutica frente a la isquemia cerebral. En modelos animales, la expresión de iNOS ocurre a las 12-48 horas después del comienzo del ataque isquémico, con lo que la ventana para el tratamiento se amplía, incluso para aquellos pacientes en los que los tratamientos trombolíticos no hayan sido efectivos (Forster et al., 1999).

1.3. LA-419 y ONO-1714

1.3.1. LA-419

Los laboratorios LÁCER S.A. han diseñado un donador de NO, denominado LA-419 (LÁCER SA, 2005). Éste producto es un nitrato orgánico que contiene un grupo tiol encargado de proteger el NO formado, convirtiéndolo en nitrotiol, para evitar que sea degradado por radicales libres. Varios estudios demuestran que el tratamiento con LA-419 mejora la interacción entre eNOS y su regulador positivo, Hsp90, lo que mantiene los niveles de esta enzima, y con ello la beneficiosa síntesis de NO a nivel endotelial en un modelo de hipertrófia cardíaca (Paulis and Simko, 2007; Ruiz-Hurtado et al., 2007).

Distintos experimentos han mostrado que LA-419 tiene efectos antiarterioescleróticos, antiinflamatorios, antioxidantes y antitrombóticos (Vilahur et al., 2004; Hernandez et al., 2005; Porras et al., 2008; Salas E and Badimon L, 2006), además de mantener la presión sanguínea y no desarrollar tolerancia (como ocurre en el tratamiento con nitratos) (Ruiz-Hurtado et al., 2007).

El producto LA-419, como tratamiento para desórdenes cardiovasculares, ya ha completado exitosamente la fase clínica I y actualmente, se están llevando a cabo los ensayos correspondientes a la fase clínica II (Megson and Leslie, 2009).

Estudios previos en el laboratorio han demostrado que el producto LA-419 podría servir también como tratamiento protector frente a un infarto cerebral. Así, en ensayos donde se administró el donador, por vía oral, antes de someter a las ratas a hipoxia global se ha observado un descenso en la expresión de nNOS en neuronas tipo II de la corteza cerebral, así como un descenso en el número de células inmunorreactivas para iNOS y nitrotirosina (Serrano et al., 2007). Por otro lado, ensayos de isquemia focal mediante la administración intracerebral del péptido vasoconstrictor endotelina-1, en ratas tratadas previamente con LA-419, mostraron una disminución del volumen del infarto a los 7 días medido mediante resonancia magnética frente a un grupo control isquémico no tratado (Martinez-Murillo et al., 2007).

1.3.2. ONO-1714

ONO-1714 es un inhibidor selectivo de la iNOS, derivado de la ciclo amidina (Whittle, 2002; Naka et al., 2000). (Figura 1.12)

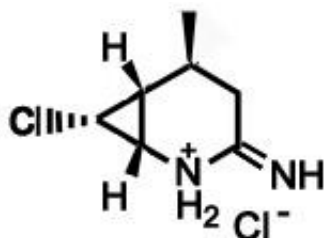


Fig. 1.12. Estructura de la molécula de ONO-1714. Tomado de Pozo Rodrigálvarez A, et al., (2012)

Es capaz de inhibir esta isoforma con una K_i de 1.88 nM en humanos y roedores. Es más selectivo y potente que otros inhibidores específicos de iNOS como la aminoguanidina (AG) o L-NMMA. Estudios en ratón concluyen que ONO-1714 es 875 veces más potente que L-NMMA y 4900 veces más potente que AG (Naka et al., 2000).

Otra ventaja de este inhibidor es que no afecta a la actividad de eNOS, con lo que se mantiene el flujo sanguíneo (Shibuta et al., 2003). Por ahora, se ha comprobado su efecto beneficioso en condiciones de sepsis asociada a daño o disfunción en los pulmones durante una endotoxemia en diferentes modelos animales (Jian et al., 2005;

Ogasawara et al., 2003; Yuba et al., 2007), e incluso en daños intestinales por isquemia-reperfusión (Naito et al., 2004).

El laboratorio del Dr. Javier Pérez-Castells de la Facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo CEU, ha desarrollado un nuevo sistema para la síntesis de ONO 1714 (Pozo-Rodríguez et al., 2012). Con estos datos ya recogidos, este compuesto puede ser una poderosa herramienta para la protección de las neuronas ante un ataque isquémico.

1.4. MODELOS EXPERIMENTALES *in vivo*

Para el estudio básico de los procesos y las alteraciones fisiológicas y/o histológicas que ocurren en un infarto cerebral existen diferentes modelos experimentales en roedores (Sacco et al., 2007; García-Bonilla et al., 2011). Además, estos modelos permiten adquirir conocimientos sobre los efectos de nuevos tratamientos y comprobar si son capaces de minimizar el daño de forma segura y efectiva, lo que es importante para su posterior aplicación clínica.

Como ya se ha explicado, la isquemia puede clasificarse según su origen (isquémico o hemorrágico), su duración (temporal o permanente) y/o la extensión o las áreas afectadas (focal o global). Es necesaria la correcta elección de un modelo u otro, según lo que se quiera estudiar. Es posible, que alguno de los más de 50 agentes neuroprotectores que han pasado a ensayos clínicos de fase III sin haber tenido efectos concluyentes aun habiendo sido exitosos en modelos animales (Cheng et al., 2004), haya sido por una mal desarrollo o evaluación del modelo experimental, entre otras causas (García-Bonilla et al., 2011).

El 85% de los ictus tienen un origen isquémico por la obstrucción de un vaso sanguíneo, y más de la mitad de estos infartos isquémicos ocurren en el territorio de la Arteria Cerebral Media (MCA). Es por esto, que la mayoría de los modelos se basan en la oclusión de esta arteria, generando un tipo de infarto focal. En primates se ha observado que la oclusión de la MCA durante una o dos horas causa déficits neurológicos leves, mientras que si la oclusión se prolonga durante seis u ocho horas los déficits pasan a ser graves (Crowell et al., 1970).

Como consecuencia, actualmente, los modelos experimentales más utilizados son los referidos a la oclusión de la MCA, ya sea de manera proximal o distal, o de forma temporal o permanente. Estos modelos en roedores (rata y ratón) pueden clasificarse según la siguiente tabla (Tabla 1.3):

	GLOBAL	FOCAL
PERMANENTE	Decapitación	Electrocoagulación Fototrombosis Endotelina
AMBOS		Ligadura proximal de la MCA Intraluminal
TEMPORAL		Embólico

Tabla 1.3. Clasificación de los distintos modelos de oclusión de MCA

Recientemente, investigadores españoles se han reunido para publicar una guía de recomendaciones en la aplicación de modelos animales para el estudio del ictus (García-Bonilla et al., 2011) que, en cuanto a la elección del modelo experimental, se puede resumir en el siguiente esquema (Tabla 1.4).

MODELO	ESTUDIO	RECOMENDACIÓN PARA SU APLICACIÓN	RECOMENDACIÓN DE "NO USO"
Oclusión proximal MCA: Sutura intraluminal	Neuroprotección fase aguda (24-72h)	Transitorio: 1-2h de oclusión Permanente	No usar para estudios con rtPA
	Neurorreparación (semanas)	Seguimiento 21 días mínimo	
Oclusión distal MCA	Neurorreparación, neuroplasticidad, angiogénesis		Fuente de luz fría para inducir trombosis En ratón, no realizar oclusión uni/bilateral de las carótidas No usar si el objetivo del estudio es el edema

Tabla 1.4. Se muestran las recomendaciones para la elección de los modelos experimentales de MCAO. Modificado de Guía de recomendaciones en la aplicación de modelos animales para el estudio del ictus de García-Bonilla L et al. (2011)

El principal problema de la mayoría de los modelos experimentales es la elevada mortalidad y la variabilidad del tamaño de infarto entre individuos.

La oclusión distal (Longa et al., 1989) de la Arteria Cerebral Media por filamento intraluminal muestra una elevada mortalidad (28%) frente al modelo de oclusión proximal (Shigeno et al., 1985) o de electrocoagulación (Bederson et al., 1986b) de la MCA. Esta mortalidad posiblemente sea debida a que el volumen del infarto en ese caso es mayor y afecta a más áreas cerebrales además de a la corteza. Además, el tipo de operación de los modelos transcraneales, es más sencillo y corto. A lo que se suma que la variabilidad en cuanto al tamaño de la lesión entre individuos es menor.

La diferencia entre el modelo de oclusión proximal de la MCA por ligadura frente al de oclusión por electrocoagulación, es que este último muestra una región cerebral de lesión no isquémica y una evolución de la lesión diferente, con lo que no estaría muy aconsejado para el estudio de la isquemia cerebral (Agulla J et al., 2011).

Tanto el modelo intraluminal, como el de ligadura proximal de la MCA están recomendados en el estudio de neuroprotección en fase aguda y teniendo en cuenta, que el segundo modelo tiene menor variabilidad y mayor supervivencia, es el que se ha elegido para realizar los estudios de los compuestos LA-419 y ONO-1714.

Además de la elección del modelo de experimentación, hay que tener en cuenta otros factores como:

- **Especie y cepa.** Pueden utilizarse ratas o ratones. En cuanto a las ratas, se aconseja la cepa Wistar, desaconsejando la utilización de ratas de la subcepa Wistar Kyoto, que desarrollan tamaños de infarto muy pequeños, y la cepa Sprague Dawley en la que se observa variabilidad en los volúmenes de infarto (García-Bonilla et al., 2011). Mientras, en ratón, la cepa C57BL/6 en modelos de isquemia focal permanente por ligadura de la MCA, muestran infartos mayores que la cepa Sv129. Sin embargo, en una isquemia global esta cepa C57BL/6 es más sensible que los ratones BALBc. Por otro lado, BALBc muestran infartos mayores que C57BL/6 cuando el infarto focal es provocado intraluminalmente. Seguramente, esto se deba a las diferencias entre las arterias colaterales y la sensibilidad a la muerte celular por excitotoxicidad. C57BL/6 muestran un pobre desarrollo de las arterias comunicantes posteriores, lo que limita el flujo colateral al territorio distal de la MCA

(Carmichael, 2005). La importancia del empleo de ratones, es por el uso de animales modificados genéticamente (García-Bonilla et al., 2011).

- **Edad.** Lo ideal es que las ratas pesen entre 250-350 g y que los ratones se encuentren entre las 8-12 semanas (25-30 g) (García-Bonilla et al., 2011).
- **Sexo.** A las edades ideales estipuladas, se recomienda el uso de machos, puesto que las hembras, aún son jóvenes y se encuentran protegidas por los estrógenos naturales (García-Bonilla et al., 2011).
- **Temperatura.** Tiene un efecto importante en el grado de daño cerebral. La hipotermia tiene un efecto neuroprotector (Busto et al., 1989), mientras que la hipertermia agrava el daño por aumentar los requerimientos metabólicos tisulares (Morikawa et al., 1992). Se recomienda, por esto, que la temperatura corporal sea mantenida a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante el proceso quirúrgico (García-Bonilla et al., 2011).
- **Glucemia.** Al igual que ocurre con la temperatura, niveles de glucosa en sangre elevados o bajos pueden influir en el daño cerebral. Por un lado, la hiperglucemia puede aumentar el daño cerebral, puesto que la glucosa durante el episodio isquémico se metaboliza de manera anaeróbica provocando una acumulación del lactato, lo que conlleva a una acidosis láctica (Warner et al., 1995). Mientras, la hipoglucemia, puede tener también un efecto perjudicial a nivel global, ya que la glucosa es el principal sustrato energético del cerebro.
- **Mantenimiento.** Deben emplearse ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con una temperatura (óptima de 22°C) y una humedad (óptima de 50%) controladas (García-Bonilla et al., 2011).

2.HIPÓTESIS y OBJETIVOS

La necesidad de descubrir nuevas terapias para el tratamiento de las enfermedades que afectan a la unidad neurovascular y la implicación del NO en ella, ha llevado a centrar esta investigación en el sistema NOS, ya que éste ofrece muchas posibilidades como diana terapéutica.

Las propiedades antitrombóticas, anti-isquémicas y antioxidantes del producto LA-419 y la experiencia previa en el laboratorio que define a este producto como posible agente neuroprotector (Martinez-Murillo et al., 2007; Serrano et al., 2007; Fernandez et al., 2010), sugiere investigar más a fondo su posible efecto terapéutico y sus mecanismos de acción en un modelo murino de ictus reproducible y que se asemeje al que ocurre en humanos. El hecho que el NO producido por eNOS actúe como un potente vasodilatador y la capacidad del producto LA-419 de mediar sus efectos a través de esta isoforma activándola, propone a este producto como potencial agente terapéutico en el caso de infarto focal a nivel del Sistema Nervioso. Las posibilidades de éxito de este objetivo están basadas en investigaciones previas que demuestran que el producto LA-419 ejerce una acción neuroprotectora en la situación de isquemia global y tras vasoespasmo prolongado (Martinez-Murillo et al., 2007; Serrano et al., 2007).

Asimismo, ya que una sobreproducción de NO parece estar implicada en la destrucción tisular que ocurre en determinados estados tales como el shock séptico, la inflamación y el infarto, se propone que los inhibidores de iNOS, como el compuesto ONO-1714, sean compuestos de alto interés para su posible aplicabilidad terapéutica. El reto en el diseño y ensayo de nuevos inhibidores de iNOS es importante, ya que además de ser activos deben presentar suficiente selectividad hacia la isoforma iNOS.

Resultados previos indican que un aumento de la producción de NO a través de la eNOS e, incluso nNOS, y la reducción del estrés oxidativo, que produce como consecuencia de la excesiva producción de NO a través de la iNOS, podrían reducir las secuelas de un accidente isquémico (Huang et al., 1996).

En base a los antecedentes citados anteriormente, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- En la situación experimental de isquemia focal permanente en el ratón se esperaría una reducción del volumen y daño del infarto tras el tratamiento de LA-419, ó de ONO-1714.

- El tratamiento con LA-419 podría regular los niveles de NO a través del sistema de las óxido nítrico sintasas.
- El LA-419 podría ser capaz de regular las cascadas isquémica, inflamatoria y apoptótica, teniendo un efecto neuroprotector. Asimismo podría promover la neurorreparación tras un ictus cerebral.
- El ONO-1714 actuaría como inhibidor de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa, disminuyendo los daños provocados por una alta y prolongada liberación de NO.

Estos antecedentes e hipótesis llevan al planteamiento de los objetivos de la investigación que se propone:

- **Objetivo (i):** Comprobar si existe reducción del volumen de infarto y en qué tiempo es mayor esa reducción por la administración de LA-419, tras pMCAO en el ratón.
- **Objetivo (ii):** Estudiar la vía de actuación de LA-419 para la regulación del sistema NOS.
- **Objetivo (iii):** Analizar los cambios de expresión de distintos marcadores de las cascadas isquémica, inflamatoria y apoptótica.
- **Objetivo (iv):** Estudiar el efecto del tratamiento con LA-419 sobre la reacción glial y la neurorreparación tras la pMCAO.
- **Objetivo (v):** Estudiar la función motora de los ratones isquémicos tratados con LA-419 y analizar su evolución temporal.
- **Objetivo (vi):** Comprobar si ONO-1714 es capaz de inhibir los efectos de iNOS *in vitro* y si su administración afecta a la viabilidad celular.
- **Objetivo (vii):** Analizar si la administración crónica de ONO-1714 es capaz de reducir el volumen de infarto tras la pMCAO en el ratón.

Con el desarrollo de estos objetivos, no sólo se pretende conocer en profundidad los mecanismos de respuesta y autodefensa que se ponen en marcha en el Sistema Nervioso Central tras la afectación de la unidad neurovascular, sino además tratar de

identificar compuestos farmacológicos con actividad específica para prevenir y/o paliar los efectos de la isquemia cerebral. El desarrollo de estos objetivos proveerá de los datos necesarios para ampliar el conocimiento sobre la función del sistema NOS en la regulación fisiológica de la unidad neurovascular, y en la situación patológica de ictus isquémico. Los resultados de este trabajo podrían proporcionar datos que posibiliten una aplicabilidad práctica de los productos LA-419 y ONO-1714.

3.MATERIALES y MÉTODOS

3.1 MODELO EXPERIMENTAL

Los estudios se han realizado en ratones macho C57BL/6 de 12 semanas, con un peso entre 25-30 g, procedentes del Animalario del Instituto Cajal. Los animales fueron aclimatados durante una semana en un cuarto de temperatura controlada con un ciclo luz/oscuridad 12:12, teniendo acceso a la comida y a la bebida *ad libitum*. Todos los procedimientos cumplieron con las normas de la Directiva de la Unión Europea (2010/63/UE) relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos y con el protocolo aprobado por el Comité de Bienestar Animal del Instituto Cajal.

El modelo isquémico en el que se centraron los estudios fue la isquemia cerebral focal provocada por oclusión permanente mediante ligadura de la Arteria Cerebral Media (pMCAO) siguiendo el protocolo de Colak G y colaboradores con modificaciones (Colak et al., 2011). Los animales fueron anestesiados con isoflurano (Isoba® Vet, Schering-Plough, Middlesex, UK) al 3% para inducción y al 2% para mantenimiento. La temperatura se mantuvo en 36.5°C con el uso de una manta eléctrica (HB 101/2; Panlab S.L., Cornella, España).

La oclusión de la MCA se realizó como se describe, brevemente, a continuación (Figura 3.1). Se hizo una incisión entre el ojo y el canal auditivo externo derechos y se disecó el músculo temporal. A continuación, se realizó una craneotomía local, exponiendo la MCA común y se siguió abriendo hasta observar la bifurcación. Entonces se ligó permanentemente la MCA con una sutura de monofilamento de nailon 8/0.

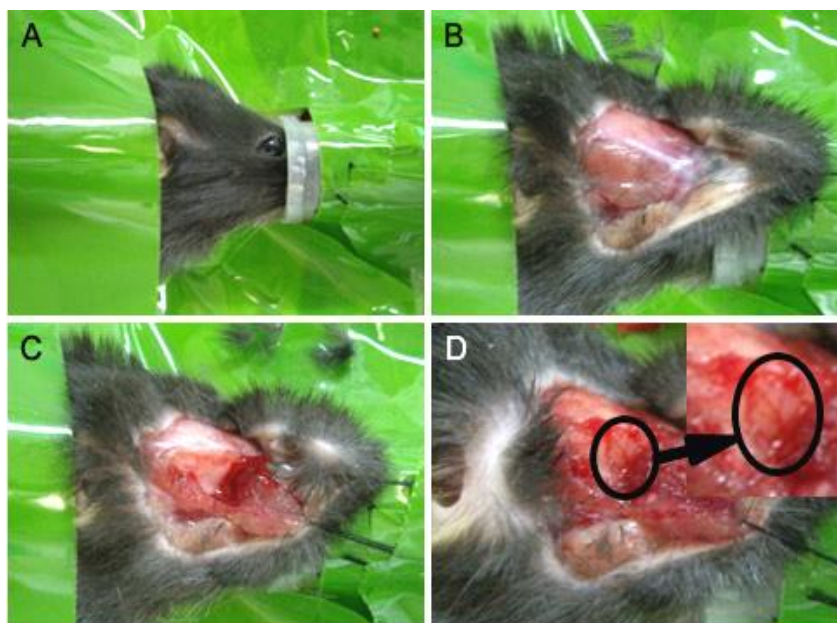


Figura 3.1. Fotos del procedimiento quirúrgico. A. colocar al ratón en posición lateral. B. Separación de la piel, exponiendo el músculo temporal. C. Retirar músculo exponiendo hueso parietal, se trepana y se retira. D. Tras retirar el hueso se expone la Arteria Cerebral Media y se liga. Imágenes propias.

Tras la operación, los animales fueron mantenidos en la manta eléctrica hasta que se recuperaron y posteriormente, se devolvieron a sus jaulas continuando con el acceso libre a la comida y bebida.

3.2. LA-419

3.2.1 Grupos experimentales

Los ratones para los estudios con LA-419 se dividieron en los siguientes grupos:

Grupo A: Grupo de ratones isquémicos.

Grupo B: Grupo de ratones isquémicos inyectados con LA-419 tras la operación.

B.1: LA-419 fue inyectado 15 minutos después de la operación.

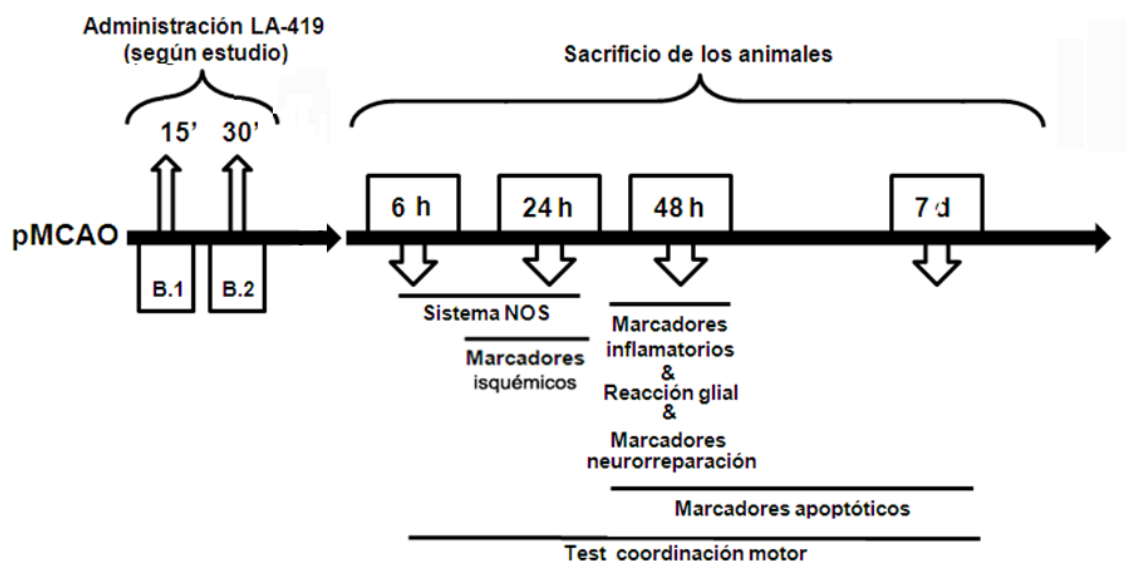
B.2: LA-419 fue inyectado 30 minutos después de la operación.

Grupo S: Grupo *Sham operated*. Se realiza todo el procedimiento quirúrgico excepto la ligadura de la MCA.

Grupo SV: Grupo *Sham operated* al que se inyecta el vehículo en el que va disuelto el fármaco.

Grupo SL: Grupo *Sham operated* al que se inyecta LA-419.

El siguiente esquema muestra cómo se organizaron los estudios y los animales empleados en cada experimento.



Grupos	TTC	RM/WB/ HRMAS	WB		Inmuno			qRT- PCR	E. enzim	T. Coord. Motor			
	48h	24h	24h	48h	24h	48h	7d	6h	48h	6h	24h	48h	7d
A	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	9	15	5
B	B.1	5	4	5	5	5	5	5	5	5	9	15	5
	B.2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Esquema 3.1 Recorrido temporal de los objetivos del estudio y distribución de los ratones empleados en los ensayos con LA-419. Los grupos S, SV y SL contaron con una n=5 en cada caso de estudio.

3.2.2. Preparación y administración del compuesto LA-419.

El tratamiento con el compuesto LA-419 se realizó mediante inyección intraperitoneal de 250 μ l a una concentración de 30 mg/kg. El donador se disolvió en Polietilenglicol (Sigma-aldrich, P-4463) y PBS en una proporción 2:1, sonicando la muestra durante 10 minutos y manteniéndolo a temperatura ambiente.

Con la finalidad de comprobar el límite terapéutico en el que LA-419 tiene efecto beneficioso reduciendo significativamente el volumen del infarto, se establecieron dos grupos experimentales dentro de los ratones sometidos a infarto focal, a los que se inyectó el compuesto LA-419 a distintos tiempos post-infarto con posterior sacrificio a las 48 horas.

Los grupos fueron los siguientes:

- Grupo Isquémico tratado con LA-419 a los 15 minutos post-infarto (B.1.)
- Grupo Isquémico tratado con LA-419 a los 30 minutos post-infarto (B.2.)

Una vez determinado el tiempo óptimo para obtener un efecto beneficioso tras la administración del compuesto LA-419, se realizaron varios grupos de animales estudiados a distintos tiempos: 6 horas, 24 horas, 48 horas y 7 días dependiendo de las determinaciones experimentales (ver esquema 3.1).

3.2.3. Medición de los Volúmenes del Infarto

3.2.3.1. Tinción histológica TTC

Para estudiar la eficacia de LA-419, se realizó una tinción con 2,3,5-*triphenyltetrazolium chloride* (TTC, Sigma T8877) comprobando el volumen de infarto en los grupos control isquémico (A) e isquémico tratado con LA-419 a distintos tiempos (B.1y B.2), 48 horas después de la ligadura.

Para la tinción con TTC, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. El cerebro fue extraído rápidamente y cortado en frío en rodajas de 1mm con ayuda de un molde (Roboz Surgical Instrument, SA-2175). Las rodajas fueron lavadas con PBS y posteriormente, incubadas en oscuridad con 1% TTC en tampón fosfato 0,1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se retiró la tinción y se añadió PBS (Bederson et al., 1986a). El TTC es un indicador redox usado para diferenciar entre tejidos metabólicamente activos e inactivos. El compuesto es enzimáticamente reducido a TPF (1,3,5-triphenylformazan) donde el tejido vivo toma un color rojizo por acción de varias deshidrogenasas, mientras que los tejidos metabólicamente inactivos, donde las enzimas han sido degradadas, permanecen de color blanco.

Los volúmenes del infarto se determinaron colocando las rodajas coronales de cerebro sobre un papel milimetrado y fotografiándolas con una cámara digital (Pentax Optio S7). Las imágenes fueron analizadas usando el programa ImageJ 1.33u (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EEUU). Con el cursor se delimitó cada rodaja completa y la zona del infarto. Las áreas se determinaron calculando los píxeles que contienen dichas regiones y se expresaron en milímetros cuadrados. Se realizó entonces el cálculo de volúmenes en mm³. Posteriormente, en cada animal se comparó la zona infartada con el volumen total del cerebro, excluyendo el edema por superposición del hemisferio contralateral con el hemisferio ipsilateral. (Hurtado et al., 2010).

3.2.3.2. Imagen por Resonancia Magnética

Los cerebros de los ratones de los grupos isquémicos tratados con LA-419 a los 15 minutos (B.1) y del grupo control isquémico (A) fueron, por otro lado, analizados en un estudio ciego por resonancia magnética en el CAI de Resonancia Magnética del Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid, 24 horas después de la operación.

Las imágenes fueron adquiridas en un Bruker Biospec 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania) con un campo principal de 4,7 Teslas y un diámetro de 40 cm. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de oxígeno e isoflurano y se colocaron en posición boca abajo, durante el experimento la respiración del animal fue controlada.

Las imágenes tridimensionales T2WI se tomaron en la dirección coronal, axial y sagital. Los parámetros de estas imágenes son: tiempo de repetición (TR)=2200 ms, tiempo de eco (TE)=118 ms, campo de visión (FOV)=2.56x2.56x1.6 cm³ y número de promedios (NA)=1. Por otro lado, las imágenes de difusión (DWI) se adquirieron mediante una secuencia spin-echo (TR/TE=ms 2500/70) con un FOV 2.56x2.56 cm², un grosor de corte de 1 mm y, una matriz de adquisición de 256x128. Se analizaron un total de 11 cortes que cubrían todo el cerebro.

Las imágenes T2WI y DWI fueron analizadas utilizando el programa ParaVision (Bruker, Ettlingen, Alemania). Las imágenes T2WI se utilizaron para calcular el edema vasogénico. El alcance de este edema se determinó midiendo el área hiperintensa de estas imágenes y se expresó como porcentaje del volumen total del cerebro.

El coeficiente de difusión aparente (CDA) fue calculado utilizando la herramienta del paquete de ISA ParaVision. El volumen de edema citotóxico se calculó a partir de estos mapas de CDA mediante la medición de baja difusión y se expresó como porcentaje del volumen total del cerebro (Hesselbarth et al., 1998; Sobrado et al., 2011).

3.2.4. HR-MAS

El hemisferio ipsilateral de los ratones isquémicos control (A) e isquémicos tratados con LA-419 a los 15 minutos (B.1) fueron analizados mediante HR-MAS a las 24 horas post-infarto en un estudio ciego en el CAI de Resonancia Magnética del Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid.

La espectroscopía de alta resolución en rotación de ángulo mágico (HR-MAS, *High Resolution- Magic Angle Spinning*) permitió el análisis directo de los tejidos para obtener espectros bioquímicos de alta resolución con poca cantidad de tejido (5-20 mg), pudiendo identificar distintos perfiles metabólicos en los diferentes grupos experimentales (Cheng et al., 1996; Tomlins et al., 1998; Waters et al., 2001; Wind et al., 2001; Tsang et al., 2005).

Durante este análisis, el tejido cerebral se mantuvo a 4°C para minimizar su degradación y posibles cambios metabólicos. Los análisis se realizaron a 500,13 MHz usando un espectrómetro Bruker AMX500 11,7 T. Las muestras se colocaron en un rotor de óxido de circonio de 50 µl y se centrifugaron a 4000 Hz, para eliminar los efectos las bandas laterales de los espectros adquiridos. (Llorente et al., 2012)

Finalmente, todos los espectros se procesan utilizando el programa TOPSPIN, versión 1,3 (Bruker Rheinstetten, Alemania).

3.2.5. Estudio Inmunohistoquímico

Los grupos isquémico sin tratamiento (A) e isquémico tratado con LA-419 (B.1) a los 15 minutos post-infarto, se sacrificaron a distintos tiempos (24 horas, 48 horas y 7 días) para poder comprobar la evolución temporal por estudios inmunohistoquímicos, analizando cualitativamente la expresión de proteínas.

3.2.5.1. Fijación de los tejidos

Se realizó una fijación de los tejidos por perfusión de los ratones mediante el siguiente protocolo: Los animales fueron anestesiados a dosis eutanasicas con Equitesín (Laboratorios Jansen, EEUU) (150 mg/Kg de hidrato de cloral y 34 mg/Kg de pentobarbital) administrado mediante una inyección por vía intraperitoneal. Una vez anestesiados, se perfundieron intracardiamente con 50 mL de tampón fosfato salino

(PBS) para continuar con 100 mL de fijador (paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4). Una vez fijado el animal, se extrajo el cerebro y se postfijó durante 3 horas más por inmersión en el mismo fijador a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se criopreservó el cerebro en sacarosa al 30% en PB 0,1 M pH 7,4. (Alonso et al., 2002)

3.2.5.2. Inmunohistoquímica

Se estudiaron marcadores que se expresan en diferentes procesos relacionados con la isquemia, entre ellos el sistema de las NOS (iNOS, nNOS), la inflamación (MMP9, COX-2, Lectina de tomate, que además de microglía marca vasos (Villacampa et al., 2013)), la apoptosis (Bax), la reacción glial y los vasos sanguíneos (NG2, GFAP, Colágeno IV), y neuronas inmaduras y proliferación (Doblecortina, DCX, que marca neuroblastos (Rosell et al., 2013), Bromodesoxiuridina (BrdU ó 5-bromo-2-desoxiuridina) (Chu et al., 2012) y Ki67 (Lu et al., 2005).

El marcador de proliferación BrdU (10280879001, Roche) se administró vía intraperitoneal 2 horas antes del sacrificio de los animales a una concentración de 100 mg/kg (20 mg/mL) en NaOH 0,007 M en 1 mL de PBS pH 7,4. (Muneton-Gomez et al., 2012).

Una vez crioprotegidos, los cerebros fueron congelados a -20°C para la obtención de secciones histológicas de 40 µm mediante el uso de un criostato (CM1950; LeicaBiosystems) y recogidos en PBS.

Antes de comenzar la tinción inmunohistoquímica, los cortes fueron tratados con H₂O₂ (Panreac) al 0,3% en PBS durante 30 minutos para eliminar el efecto de la peroxidasa endógena, que puede modificar los resultados posteriores. Tras lavar con PBS, se incuban los cortes con los anticuerpos primarios (Tabla 3.1) a 4°C en agitación durante 12 horas. Después se lavan con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Tabla 3.2) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se vuelven a lavar los cortes con PBS y se incuban con una tercera capa de avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC kit, Vector, EEUU) durante 90 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, se lavan con PBS, siendo el último lavado con Tampón Acetato 0,1 M. Se revelan con DAB-Níquel-Cobalto-Glucosa Oxidasa para intensificar la reacción. Una vez inmunoteñidos los cortes, se procede a su montaje sobre portaobjetos y obtención de

fotografías de las estructuras inmunoteñidas mediante el uso de un microscopio (Axioplan 2, Zeiss, Jena, Alemania) y cámara (Polaroid DMC IE, Cambridge, MA, EEUU).

Los controles de especificidad de los anticuerpos utilizados fueron llevados a cabo incubando los cortes siguiendo el mismo protocolo, pero sin el anticuerpo primario. En ningún caso se obtuvo marcaje.

Anticuerpo	Huésped/Dilución	Referencia Casa comercial
nNOS	cabra/ 1:5000	Propio Alonso D et al, 2002
iNOS	conejo/ 1:5000	Propio Alonso D et al, 2002
MMP9	conejo/1:2000	ab13458 Millipore
Cox2	conejo/ 1:5000	ab5118 Millipore
Colágeno IV	conejo/1:2000	ab6586 abcam
Lectina Tomate	biotinilado/1:150	L0651 Sigma
Bax	conejo/ 1:1500	sc-6236 / Santa Cruz Biotechnology
GFAP	conejo/ 1:2000	z0334 DakoCytomation
NG2	conejo/1:200	ab5320 Millipore
DCX	cabra/ 1: 1000	sc8066 / Santa Cruz Biotechnology
Ki67	conejo/ 1:1500	ab15580 abcam
BrdU	rata/ 1:2000	ab6326 abcam

Tabla 3.1. Anticuerpos primarios usados en los estudios inmunohistoquímicos.

Anticuerpo secundario biotinilado	Dilución	Referencia Casa comercial
Anti Cabra IgG	1:100	BA5000 Vector Laboratories
Anti Conejo IgG	1:100	BA-1000 Vector Laboratories
Anti Rata IgG	1:100	BA-9400 Vector Laboratories

Tabla 3.2. Anticuerpos secundarios biotinilados.

3.2.6. Western blot

Para determinación de los niveles de proteína, los cerebros de los grupos isquémico sin tratamiento (A) e isquémico tratado con LA-419 (B.1) a los 15 minutos post-infarto, así como los grupos sham, se sacrificaron a las 24 y 48 horas, para estudiar una evolución temporal de la expresión de los distintos marcadores.

Tras sacrificar los animales de experimentación por dislocación cervical, los cerebros fueron extraídos en fresco, con la ayuda del molde anteriormente indicado (Roboz Surgical Instrument, SA-2175), se delimitaron las zonas de corteza cerebral adyacentes al infarto, particularmente área de penumbra, y al mismo tiempo, la parte de corteza contralateral a la región. La proteína se extrajo disgregando el tejido a 4°C en tampón de homogenización (HOBf) y sonicando durante 20 segundos. Posteriormente, se centrifugaron los tejidos a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó mediante un NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies).

Las muestras, un control de carga y el patrón de pesos moleculares (ref 161-0324; Bio-rad), fueron cargados en geles de SDS-PAGE del 7,5% ó 12,5% de acrilamida/bis-acrilamida (según el peso molecular de la proteína) y transferidas a membranas de PVDF (HybondTM-P, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania). El protocolo de detección que se siguió fue el siguiente: Se bloquearon las membranas durante una hora a temperatura ambiente en agitación con tampón de bloqueo (5% de leche desnatada, 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, P-1379) en TBS). Pasado este tiempo, se incubaron con los anticuerpos primarios en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en agitación (Tabla 3.3). Después se lavaron con tampón de lavado (7,5% de leche desnatada y 0,1% de Tween 20 en TBS) y se incubaron con el

anticuerpo secundario unido a estreptavidina peroxidasa (Tabla 3.4) en tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, tras los lavados, las membranas fueron reveladas con el kit ECL siguiendo las indicaciones del fabricante (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania) y reveladas exponiéndolas durante distintos tiempos (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare, UK).

Anticuerpo	Huesped/Dilución	Referencia Casa comercial
nNOS	cabra/ 1:40000	Propio Alonso D et al, 2002
iNOS	conejo/ 1:5000	Propio Alonso D et al, 2002
Hsp90	conejo/1:5000	ab13495 abcam
p-Akt 1/2/3 (Thr 308)	conejo/ 1:500	sc-16646-R / Santa Cruz Biotechnology
MMP9	conejo/1:500	ab13458 Millipore
GFAP	conejo/ 1:10000	z0334 DakoCytomation
β-III-Tubulina	ratón/ 1:60.000	G712A Promega

Tabla 3.3. Anticuerpos primarios usados para Western blot

Anticuerpo secundario HRP	Dilución	Referencia Casa comercial
Anti Cabra IgG	1:10000	A5420 Sigma
Anti Conejo IgG	1:10000	na934v GE healthcare
Anti Ratón IgG	1:10000	a9309 sigma

Tabla 3.4. Anticuerpos secundarios usados en el Western blot.

Una vez procesadas las membranas para la detección del antígeno de estudio, estas se lavaron y se reincubaron con anti-β-III-Tubulina durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente con su anticuerpo secundario y consiguiente revelado como se indicó anteriormente para la realización de estudios comparativos de carga de proteína.

Finalmente, las películas fueron analizadas en el densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad) con el programa Quantity One (Bio-Rad) para obtener unos valores de proteína semicuantitativos.

3.2.7. qRT-PCR

La cuantificación de la expresión génica de las isoformas nNOS, iNOS y eNOS se realizó mediante la técnica de qRT-PCR (quantitative Real Time-PCR). Se analizaron los grupos isquémico sin tratamiento (A) y el tratado con LA-419 a los 15 minutos post-infarto (B.1). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 6 horas después de la operación. Los cerebros fueron extraídos en fresco rápidamente, recogiendo la misma proporción de tejido que la utilizada para western blot (tanto el lado ipsilateral como contralateral). Una vez recogido el tejido fue congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C.

El ARN fue extraído con trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) y medida su concentración con el nanodrop para, posteriormente, retro-transcribirlo usando la retro-transcriptasa SuperScript (Invitrogen). La qRT-PCR se realizó usando el termociclador y el programa de Chromo4 (MJ Research, Hercules, CA, EEUU).

La amplificación se hizo en un volumen final de 25 µL, conteniendo 2 µL de ADNc, 2 µL de la mezcla de primer (a 10 nM) (Tabla 3.5) y 12,5 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y 8,5 µL de agua. Los valores se determinaron interpolando los resultados en la curva estándar. Todos los valores de expresión génica fueron normalizados de acuerdo con los valores obtenidos para el 18S ARNr de cada muestra.

Gen	Secuencia del primer
nNOS	S: CTGGTGAAGGAACGGGTCAG
	AS: CCGATCATTGACGGCGAGAAT
eNOS	S: GGC TGG GTT TAG GGC TGT G
	AS: CTG AGG GTG TCG TAG GTG ATG
iNOS	S: GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA
	AS: GTGGACGGGTGCGATGTCAC
18S ARNr	S: ATGCTCTTAGCTGAGTGTCCCG
	AS: ATTCCTAGCTGCGGTATCCAGG

Tabla 3.5. Primers usados para la qRT-PCR. S: cadena sentido; AS: cadena antisentido

3.2.8. Ensayos de actividad enzimática

Estos ensayos fueron llevados a cabo en el laboratorio de la Dra. María Jesús Oset Gasque por el Dr. José Joaquín Merino (Dpto de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM). En un estudio ciego, se analizaron las zonas de corteza cerebral adyacentes al infarto, particularmente área de penumbra, y al mismo tiempo, la parte de corteza contralateral a la región, el grupo isquémico control (A) y el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1) 48 horas después de pMCAO, para comprobar si existían diferencias en la actividad de SOD-1 y Caspasa-3.

3.2.8.1. Estimación SOD-1

Se aislaron los sinaptosomas de corteza el grupo A y B.1, siguiendo el protocolo de Merino et al. (Merino et al., 2000; Merino et al., 2011). La actividad superóxido dismutasa (SOD-1) fue estudiada en estos sinaptosomas en placas de 48 pocillos en tampón 0.1 mM EDTA, 50 mM Carbonato sódico y 96 mM de nitroblue tetrazolium (NBT), siguiendo el protocolo de Kono (Kono, 1978). La reacción colorimétrica se llevó a cabo añadiendo 12,5 μ M de hidrocloreuro de hidroxilamina (pH 6,0) a cada pocillo. La auto-oxidación de la hidroxilamina se observó midiendo durante 2 minutos el cambio de densidad óptica a 560 nm en intervalos de 30-60 segundos. El incremento de la absorbancia entre la primera medida (a los 15 minutos) y la segunda (pasada una hora) fue cuantificado y normalizado en relación a los mg de proteína total.

3.2.8.2. Ensayo Caspasa-3

Las cortezas cerebrales extraídas de los grupos A y B.1 se lavaron rápidamente con PBS y se lisaron mediante tampón de lisis celular (10 mM Tris-HCl, 10 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5, 130 mM de NaCl, 0,5% de Triton X-100, 10 mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$). Los lisados se centrifugaron a 13.000 g durante 5 minutos, para aislar los sinaptosomas donde se midió la actividad Caspasa-3. Cada muestra, de 15 μ l, se cargó y se incubó en el tampón de ensayo (HEPES 20 mM, pH 7,5, 10% glicerol, DTT 2 mM) a 37 °C durante 2-4 horas.

Se estudió la actividad de la caspasa en los tejidos homogeneizados mediante la adición de un péptido de la caspasa conjugado con la molécula p-nitroanilina (pNA). La escisión del péptido por la caspasa libera el cromóforo pNA, que pudiéndose cuantificar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm. El nivel de

actividad enzimática de la caspasa en la fracción de sinaptosoma es directamente proporcional a la reacción colorimétrica. Los resultados se expresaron como porcentaje como Incremento de las unidades de fluorimetría por mg de proteína total en los sinaptosomas a las 18 horas.(Arce et al., 2010)

3.2.9. Test coordinación motora “Tightrope”

En este estudio, se ha elegido un test objetivo que servía para comprobar la recuperación de su fuerza muscular y coordinación motora, tras la ligadura de la MCA, según el siguiente protocolo (Miquel and Blasco, 1978). Se colocaron los ratones en mitad de una cuerda tensa de 60 cm de longitud a una altura de 40 cm y se cronometró el tiempo que tardaban en llegar a alguno de los extremos de la misma, siendo el tiempo máximo permitido de 1 minuto

Este test se llevó a cabo a distintos tiempos post-operatorios (6 horas, 24 horas, 48 horas y 7 días), tanto al grupo control isquémico (A) como al grupo tratado con LA-419 a los 15 minutos post-infarto (B.1) para comparar y valorar la evolución en ambos casos. No se repitió el test al mismo animal para evitar que los tiempos de llegar a cualquiera de los extremos se vieran modificados por simple aprendizaje y no por el tratamiento.

3.2.10. Expresión de los resultados y análisis estadístico

Los resultados han sido analizados mediante el test de t-Student (usando programa Microsoft Excel). Se considera como significativo: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.3. ONO-1714

3.3.1. Ensayos detección iNOS *in vitro*

Con el objetivo de comprobar la inhibición de ONO-1714 sobre la isoforma iNOS, se realizaron ensayos *in vitro* en macrófagos activados extraídos del peritoneo de los ratones.

Se usaron ratones hembra CD-1 provenientes de los laboratorios Charles River (Wilmington, Massachusetts). Los animales fueron mantenidos en un cuarto de temperatura controlada, con un ciclo de luz: oscuridad 12:12, teniendo libre acceso a la comida y al agua. Todos los procedimientos han cumplido con la Directiva de la Unión Europea (86/609/EEC) y el protocolo estaba aprobado por el comité del bienestar animal del Instituto Cajal.

Los macrófagos fueron extraídos de ratones CD-1 lavando la cavidad peritoneal con 9 mL de una solución estéril de PBS pH 7.4 con Heparina 0,2% (Chiesi, 962357.9). Las células fueron lavadas y resuspendidas en DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium; Gibco BRL, NY, EEUU) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS; Gibco BRL, NY, EEUU), glutamina 2 mM y 100 u/mL de estreptomicina (Gibco BRL, NY, EEUU). Se cultivaron 10^6 células por pocillo en una placa Falcon de 24 pocillos en una estufa a 37°C con un 5% de CO₂ durante 48 horas.

Pasado este tiempo, se cambió el medio por otro suplementado con LPS (100 ng/mL; Sigma, L8274) e INF- γ (100 ng/mL; Sigma (St. Louis, MO, EEUU), para inducir la producción de NO por la iNOS presente en los macrófagos, en presencia o ausencia de ONO-1714 (control negativo: sólo medio; control positivo: sólo LPS e INF- γ). Tras otras 48 horas de incubación, el aumento de nitritos, derivados del NO liberado por los macrófagos activados, fue determinado por la reacción de Griess. Se añadieron 50 μ L del sobrenadante por pocillo, en una placa de 96 pocillos, junto con 50 μ L del reactivo de Griess (Fluka, 03553) y se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron ensayadas por cuadruplicado. La absorbancia de la placa se midió a 54 nm en el lector FLUOstar OPTIMA-BMG LABTECH y la concentración de nitritos de cada pocillo fue determinada por la curva estándar de nitrato de sodio. El porcentaje de inhibición fue expresado como:

$$\frac{\text{Concentración de nitrito de la muestra}}{\text{Concentración de nitrito del control positivo}} \times 100$$

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado (Ding et al., 1988).

3.3.1.1. Determinación de la viabilidad celular

En paralelo con el ensayo de Griess, los macrófagos de cada pocillo se sometieron a un ensayo de viabilidad celular mediante la prueba de sulforrodamina-B (SRB; Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Este método mide el contenido de proteína celular de cultivos adherentes o en suspensión, de acuerdo con un estudio anterior (Skehan et al., 1990). El SRB es un aminoxanteno con dos grupos sulfónicos que se unen electrostáticamente con los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas en condiciones ligeramente ácidas. Esta técnica da una tinción rosada que permite estudiar la inhibición del crecimiento celular. El enlace de SRB a proteínas celulares se midió espectrofotométricamente a 540 nm, lo que proporcionó información sobre el crecimiento celular relativo y viabilidad de las células. Las células se fijaron durante 1 hora a 4°C mediante la adición de 200 µl por pocillo de ácido tricloroacético (TCA) al 12,5% (v/v). Después, la solución de fijación se eliminó vigorosamente y las muestras se lavaron con agua. Las placas se secaron y se tiñeron con 0,4% SRB (p/v) en 1% de ácido acético (poniendo 100 µl por pocillo) durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se eliminó el SRB y los cultivos se lavaron con 1% de ácido acético para eliminar la tinción residual. Después de un secado óptimo, el colorante unido a las proteínas se solubilizó con 10 mM de Trizma base poniendo 200 µl por pocillo durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Entonces se procedió a leer las densidades ópticas lo que se realizó usando un lector de placas a 540 nm de longitud de onda.

3.3.2. Administración ONO-1714 *in vivo*

Se analizaron los grupos isquémico sin tratamiento e isquémico con tratamiento. En ambos, se procedió a la administración crónica de ONO-1714 por vía subcutánea mediante el implante de mini-bombas osmóticas Alzet (modelo 2004, 200 µl, 0,25 µl/h). La dosis diaria de liberación de ONO-1714 fue de 24 mg/kg disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO; AppliChem). Para el grupo isquémico, las bombas contenían únicamente el vehículo. El tratamiento se dispensó durante 21 días previos a la

ligadura de la rama frontal de la MCA y 48 horas después de la cirugía. La operación se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1.

Pasadas 48 h desde la cirugía, se midieron los volúmenes de infarto del grupo isquémico tratado y el grupo isquémico con vehículo, mediante tinción con TTC como se describe en el apartado 3.2.3.1.

3.3.3. Expresión de los resultados y análisis estadístico

Los resultados han sido analizados mediante el test de t-Student (usando programa Microsoft Excel). Se considera como significativo: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4. RESULTADOS

4.1.LA-419

4.1.1. OBJETIVO 1: Comprobar si existe reducción del volumen de infarto y en qué tiempo es mayor esa reducción por la administración de LA-419, tras pMCAO en el ratón.

Para abordar este objetivo, el primer estudio que se hizo fue un tratamiento de los animales de experimentación con LA-419 administrado a distintos tiempos tras la pMCAO, sacrificando a los animales a las 48 horas para medir el volumen de infarto resultante. Se analizaron los cerebros en fresco con la tinción de TTC.

Los grupos isquémicos tratados con LA-419 a los 15 ó 30 minutos tras la pMCAO (B.1, B.2 respectivamente) tienen disminuido el volumen de infarto frente al grupo control isquémico (A). En este caso, el menor volumen se localiza en los animales tratados 15 minutos post-infarto, seguido del grupo tratado a los 30 minutos aunque las diferencias siguen siendo significativas con respecto al grupo control. (Figura 4.1).

El tratamiento con LA-419, 15 minutos después de la cirugía disminuye el volumen de infarto significativamente ($p < 0.001$) siendo no detectable con la tinción de TTC. El grupo tratado con LA-419, 30 minutos después de la isquemia también muestra disminución del volumen de infarto de forma significativa ($p < 0.05$), pero en menor medida que administrando LA-419 a los 15 minutos. Los volúmenes de infarto son el resultado de calcular las medias con la desviación estándar expresados en porcentaje en relación al volumen del cerebro.

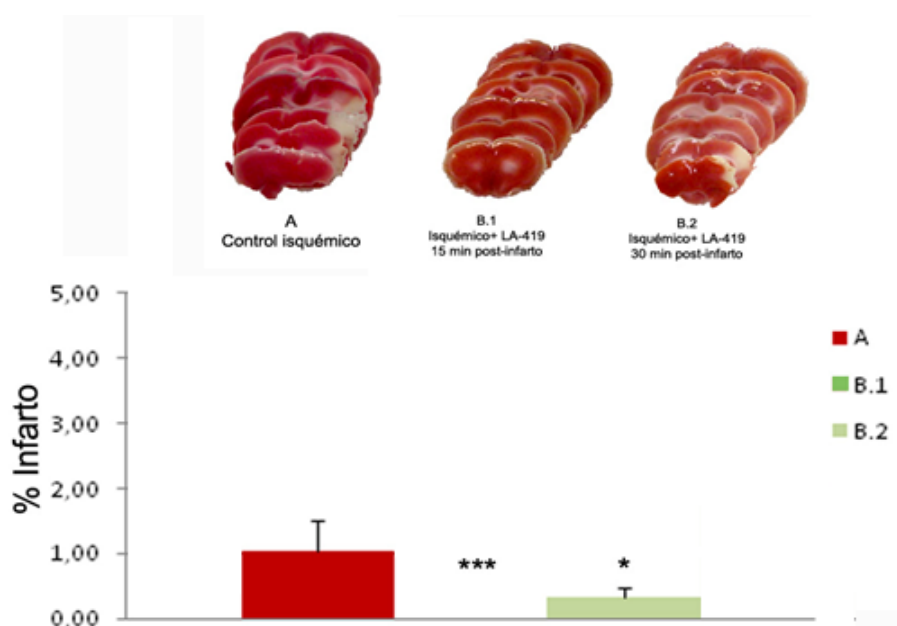


Figura 4.1. Tinción de TTC. Las áreas en blanco muestran las áreas de infarto en las secciones de 1 mm de espesor de cada grupo. Los cálculos de volúmenes de infarto de los grupos tratados con LA-419 tanto a los 15 minutos ($P<0.001$) como a los 30 minutos post-infarto ($P<0.05$) son significativamente menores comparados con el grupo isquémico control. (* $p<0.05$; *** $p<0.001$).

Además, se realizó el test motor, 48h después de la isquemia y antes de sacrificar a los animales, para comparar el vigor muscular y la coordinación motora entre el grupo control isquémico (A), con los grupos isquémicos tratados con LA-419 a los 15 y a los 30 minutos después del infarto (B.1 y B.2, respectivamente). En ambos casos, los grupos B.1 y B.2 necesitan significativamente menos tiempo para llegar a cualquiera de los extremos que el grupo A, siendo más acusada esta diferencia con el grupo B.1 que con el grupo B.2. (Figura 4.2).

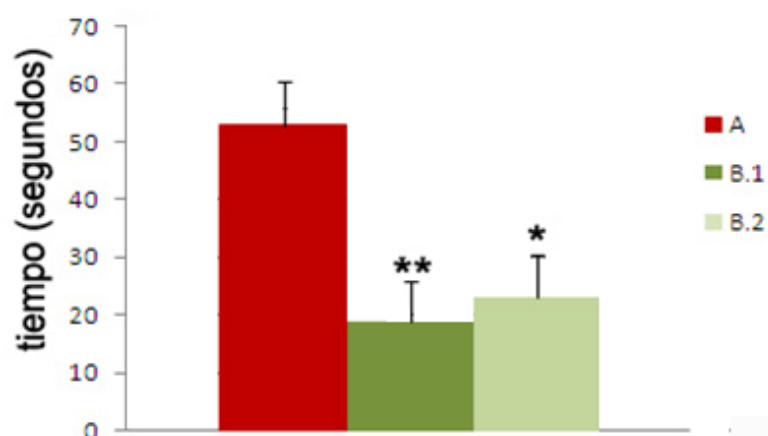


Figura 4.2 Test de coordinación motora a las 48h, los grupos tratados con LA-419 a los 15 ó 30 minutos post-infarto necesitan significativamente menos tiempo para llegar a uno de los extremos de la cuerda comparado con el grupo isquémico A. (* $p<0.05$; ** $p<0.01$).

Como conclusión obtenida con estos resultados, en los experimentos posteriores, el producto LA-419 fue administrado 15 minutos después de la pMCAO.

Se analizan posteriormente los volúmenes de infarto por resonancia magnética, para obtener un resultado más preciso, 24 horas después de la pMCAO. Estos resultados muestran que el porcentaje, tanto del volumen del edema vascular como del edema citotóxico, disminuye significativamente en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1) frente al grupo isquémico control (A). (Figura 4.3).

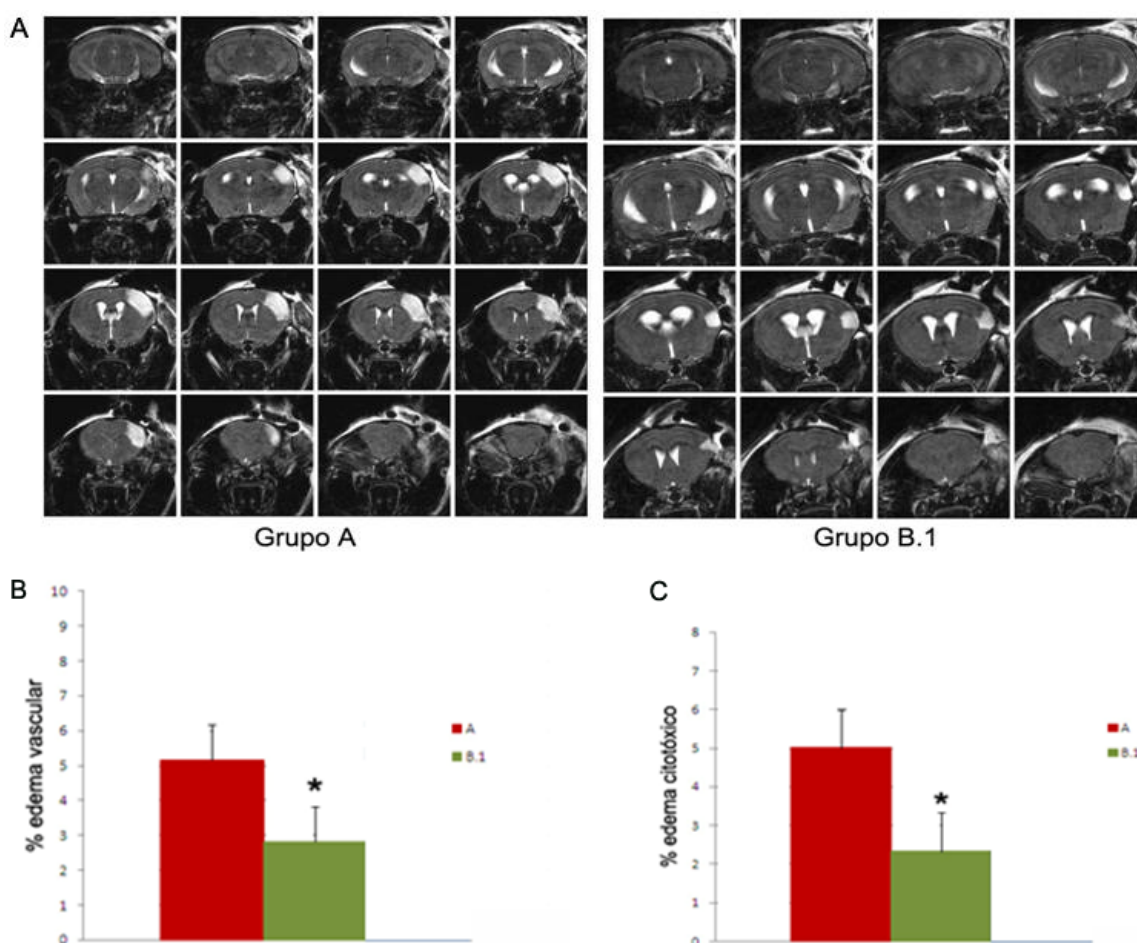


Figura 4.3. A. Imágenes de resonancia magnética (TW2) muestran las distintas áreas de infarto (de color blanco) entre los grupos isquémico e isquémico tratado con LA-419 a los 15 minutos (B.1) pasadas 24 horas desde la pMCAO. B. El porcentaje de edema vascular es significativamente menor en el grupo B.1 frente al grupo isquémico (A). C. De igual manera ocurrió con el edema citotóxico, el grupo B.1 redujo su volumen de infarto significativamente frente al grupo A. Los resultados son expresados en porcentaje del volumen de infarto frente al volumen del cerebro como medias con la desviación estándar. (* $p < 0.05$).

4.1.2. OBJETIVO 2: Estudiar la vía de actuación de LA-419 para la regulación del sistema NOS.

Para abordar este objetivo lo primero que se llevó a cabo fueron estudios de expresión génica de las tres isoformas de las Óxido Nítrico Sintetas (eNOS, nNOS e iNOS), tanto en el grupo isquémico (A) como en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1), 6 horas después de la pMCAO. La expresión de ARNm de cada uno fue dividida entre el contenido de ARNr 18S de cada muestra, obteniendo una expresión normalizada de los datos.

En cuanto a la expresión de eNOS, se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los lados ipsilaterales del grupo isquémico (A) y el tratado con LA-419 (B.1). Los niveles de esta isoforma son significativamente mayores en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1) con respecto al grupo isquémico sin tratamiento. En cambio, los lados contralaterales mantienen niveles de eNOS menores con respecto a sus propios ipsilaterales, en ambos grupos. (Figura 4.4A).

Sin embargo, al estudiar las otras dos isoformas se encuentra la situación inversa. En la isoforma nNOS, se observa que su expresión se encuentra significativamente menor en el grupo B.1 ($p < 0,001$) en comparación con el grupo A, entre sus lados ipsilaterales, mientras entre sus lados contralaterales no se observan diferencias (Figura 4.4B). Con respecto a la expresión génica de iNOS es significativamente menor ($p < 0,05$) en el lado ipsilateral del grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1) comparado con el mismo lado del grupo isquémico no tratado (A) ($p < 0,05$), mientras los niveles de expresión son significativamente mayores en el lado contralateral del grupo tratado con LA-419. (Figura 4.4C).

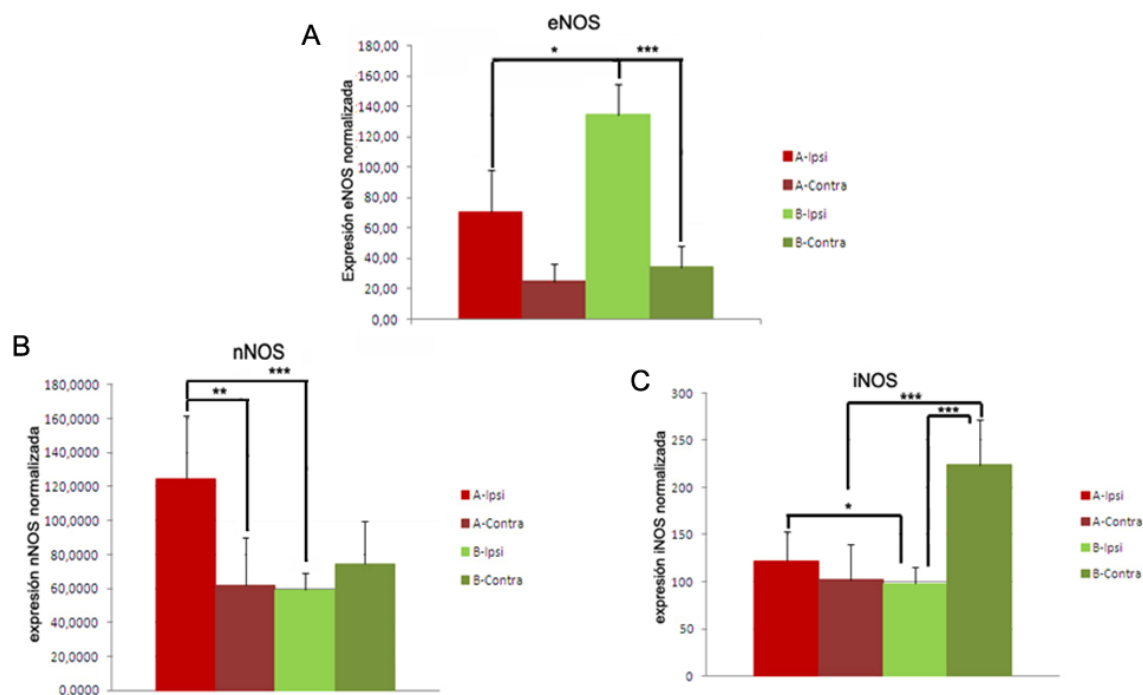


Figura 4.4. A. Se muestran los resultados de expresión de eNOS por qRT-PCR 6 horas después de la cirugía. Cabe destacar un aumento significativo en el lado ipsilateral del grupo isquémico con tratamiento (B.1), frente al mismo lado del grupo isquémico sin tratamiento (A). B. Muestra los resultados de expresión de nNOS a las 6 horas de la ligadura de la MCA. Destaca una disminución significativa en el lado ipsilateral del grupo B.1 con respecto al grupo A. C. Se muestran los resultados de expresión de iNOS por qRT-PCR en el grupo A y B.1, destacando una disminución significativa en el lado ipsilateral del grupo B.1 con respecto al mismo lado del grupo isquémico sin tratamiento. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Una vez comprobados los niveles de expresión génica pasadas seis horas desde la oclusión de la arteria cerebral media, se estudiaron, 24 horas después del infarto, los niveles de proteína de las isoformas nNOS e iNOS por Western blot y su marcaje a nivel inmunohistoquímico.

En referencia a la expresión de nNOS, se observa un aumento de su concentración en el grupo B.1, siendo más acusado en su lado contralateral. Esto hace que haya diferencias muy significativas entre este lado y su lado ipsilateral, además de con el lado contralateral del grupo A. También se notan diferencias significativas entre los lados ipsilaterales de ambos grupos, siendo más elevada la concentración en el grupo isquémico tratado con LA-419 (Figura 4.5A). En cuanto al marcaje inmunohistoquímico, en la zona periinfarto, se observa que en el grupo isquémico (A) las neuronas marcadas tienen un aspecto vacuolizado, síntoma de degeneración. Mientras que en el grupo isquémico tratado con LA-419 a los 15 minutos (B.1), las neuronas conservan su morfología normal, al igual que en los grupos sham (S y SL). (Figura 4.5B)

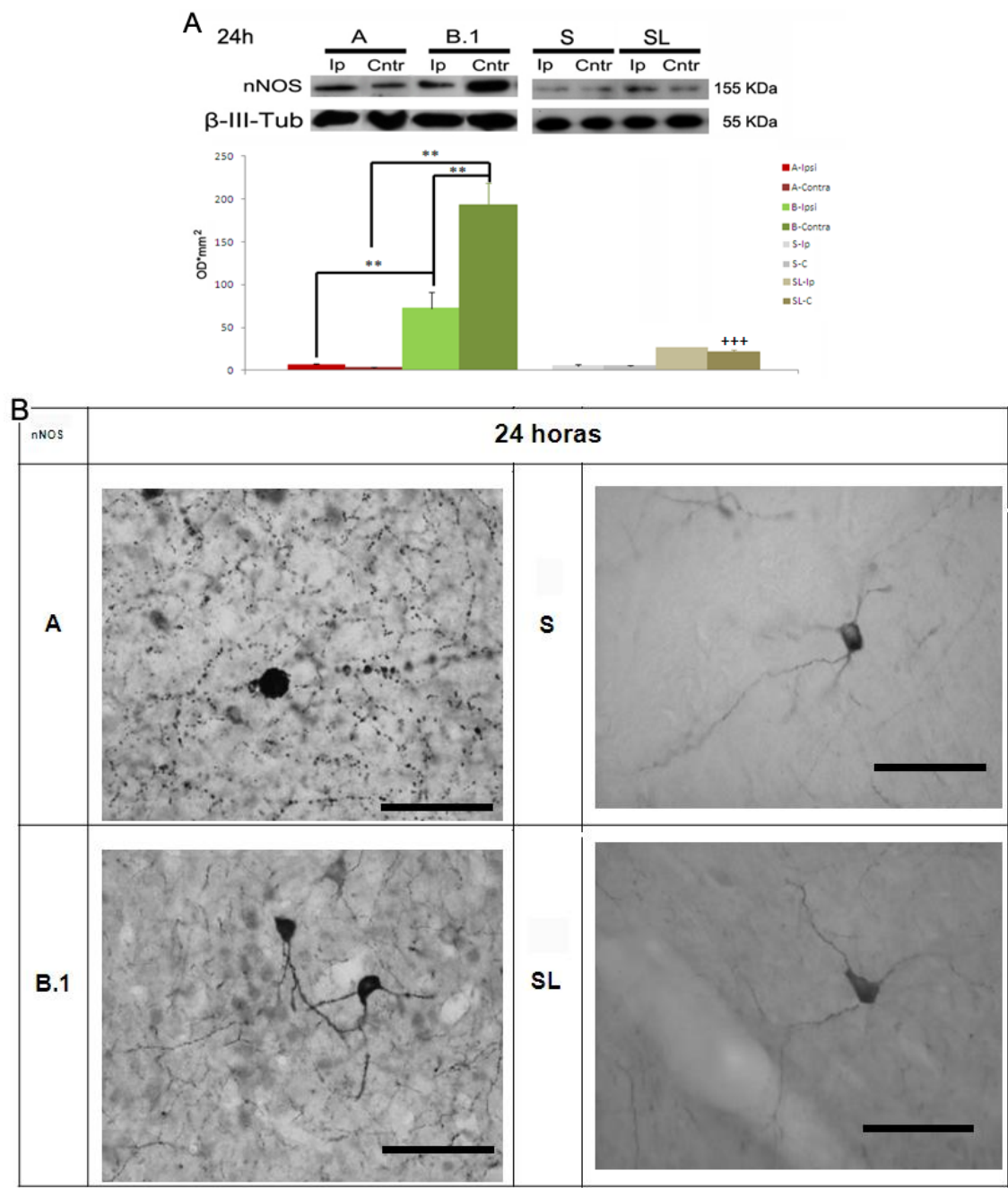


Figura 4.5. A Se muestran los resultados de expresión de nNOS a las 24 horas de la ligadura de la MCA. Se observa un aumento significativo en el lado ipsilateral del grupo B.1 frente al mismo lado del grupo A. (** $p<0.01$). B. Muestra el marcaje inmunohistoquímico de nNOS. En el grupo isquémico las neuronas marcadas tienen un aspecto degenerado frente a la morfología normal que conservan las neuronas en el grupo tratado con LA-419. Los grupos S (sham) y SL (sham+LA-419) muestran neuronas con morfología normal. Fotografías tomadas a 40x (escala 50µm) en la zona de penumbra.

En cuanto a la expresión proteica de la isoforma inducible (iNOS), se observa una disminución de sus niveles en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1) frente al grupo isquémico sin tratamiento (A). (Figura 4.6A). Datos que se correlacionan con los

obtenidos por inmunohistoquímica, donde parece encontrarse un marcaje menos intenso alrededor del infarto, en el grupo tratado con LA-419, frente al grupo isquémico en las zonas circundantes al infarto. Marcaje inapreciable en los grupos sham (S y SL) (Figura 4.6B)

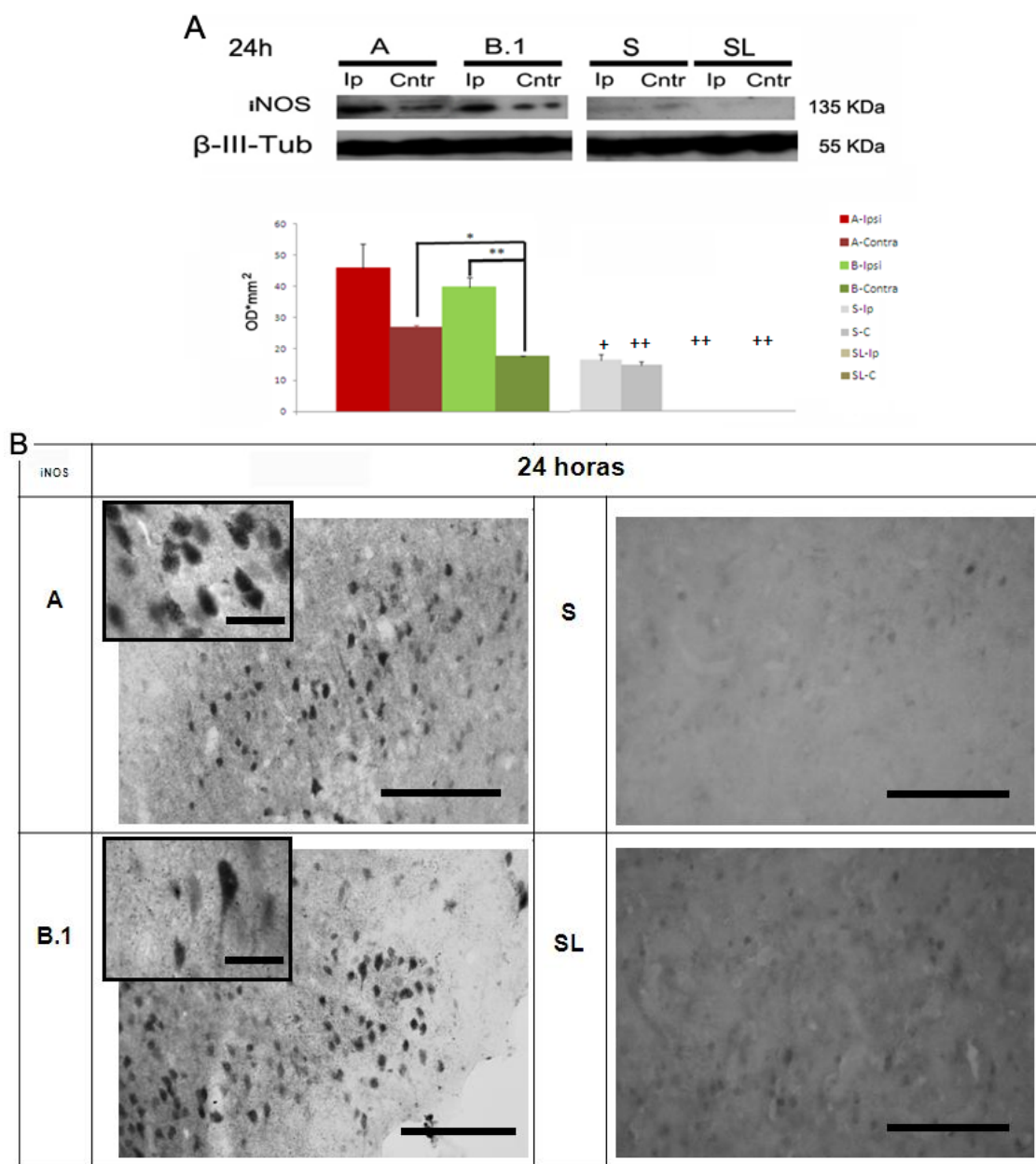


Figura 4.6. A. Los resultados por WB de iNOS muestran una disminución de los niveles de proteína a las 24h en el lado ipsilateral del grupo isquémico tratado (A) con respecto al mismo lado del grupo isquémico (B.1). (* $p<0.05$; ** $p<0.01$). B. Las imágenes inmunohistoquímicas muestran el marcaje de iNOS en ambos grupos en la zona de penumbra del infarto. Se nota una diferencia con los grupos S (sham) y SL (Sham+LA-419), donde apenas se encuentra marcaje. Fotografías tomadas a 20x (escala 100 μ m) y 100x (escala 20 μ m)

Además del estudio de las tres isoformas, se han estudiado los niveles de proteína de dos activadores, independientes de calcio, de la isoforma endotelial (eNOS), como son Akt y Hsp90.

La expresión de Akt, pasadas 24 horas desde la pMCAO, muestra que su concentración es superior en el grupo isquémico tratado con LA-419 frente al grupo isquémico sin tratamiento (A). Siendo esta diferencia muy significativa entre los lados contralaterales grupo B.1 comparando con el grupo A. Además, es significativo el aumento de los niveles de Akt en el grupo sham al que se inyectó LA-419. (Figura 4.7A)

En cuanto a la expresión de Hsp90 se encuentra aumentada en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1), frente al grupo isquémico (A) a las 24 horas. Estas diferencias son significativas entre los lados contralaterales de ambos grupos, aunque son más acusadas entre sus lados ipsilaterales. En ambos grupos, la concentración de Hsp90 es mayor en el lado contralateral que en el ipsilateral, aunque estas diferencias no son significativas (Figura 7B).

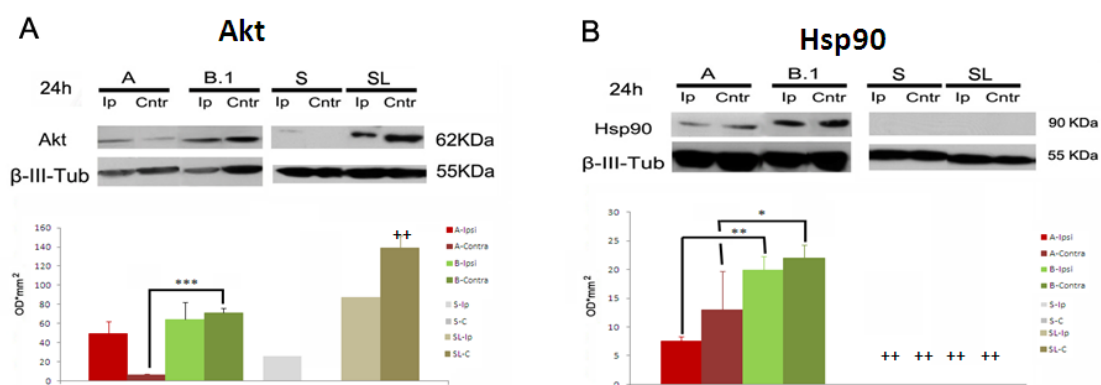


Figura 4.7.A. Se muestran los resultados de expresión de Akt a las 24 horas de la ligadura de la MCA. Se observa un aumento muy significativo en el lado contralateral del grupo B.1 frente a su lado ipsilateral y frente al contralateral del grupo A. Los niveles de Akt también se encuentran significativamente aumentados en el grupo sham al que se inyectó LA-419 (SL). B. Se muestran los resultados de expresión de Hsp90. Se observa un aumento significativo de su concentración, en el grupo B.1 frente al grupo A, comparando tanto los lados ipsilaterales como contralaterales. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.1.3. OBJETIVO 3: Analizar los cambios de expresión de distintos marcadores de las cascadas isquémica, inflamatoria y apoptótica.

4.1.3.1. Cascada isquémica

Pasadas 24 horas desde la provocación de la pMCAO, se analizan por HR-MAS los tejidos ipsilaterales de los grupos isquémico (A) y del isquémico tratado con LA-419 a los 15 minutos post-infarto. Con esta técnica es posible definir el perfil bioquímico de regiones localizadas en tejidos heterogéneos como el cerebro.

En el espectro bioquímico, despreciando el ruido, los metabolitos son determinados según el punto del espectro donde aparecen (Figura 4.8A). Principalmente se observan diferencias en Treonina 3,58 ppm. El grupo B.1 tiene un aumento significativo ($p < 0,01$) en los niveles de Thr 3,58 ppm con respecto al grupo control isquémico (A). (Figura 4.8B).

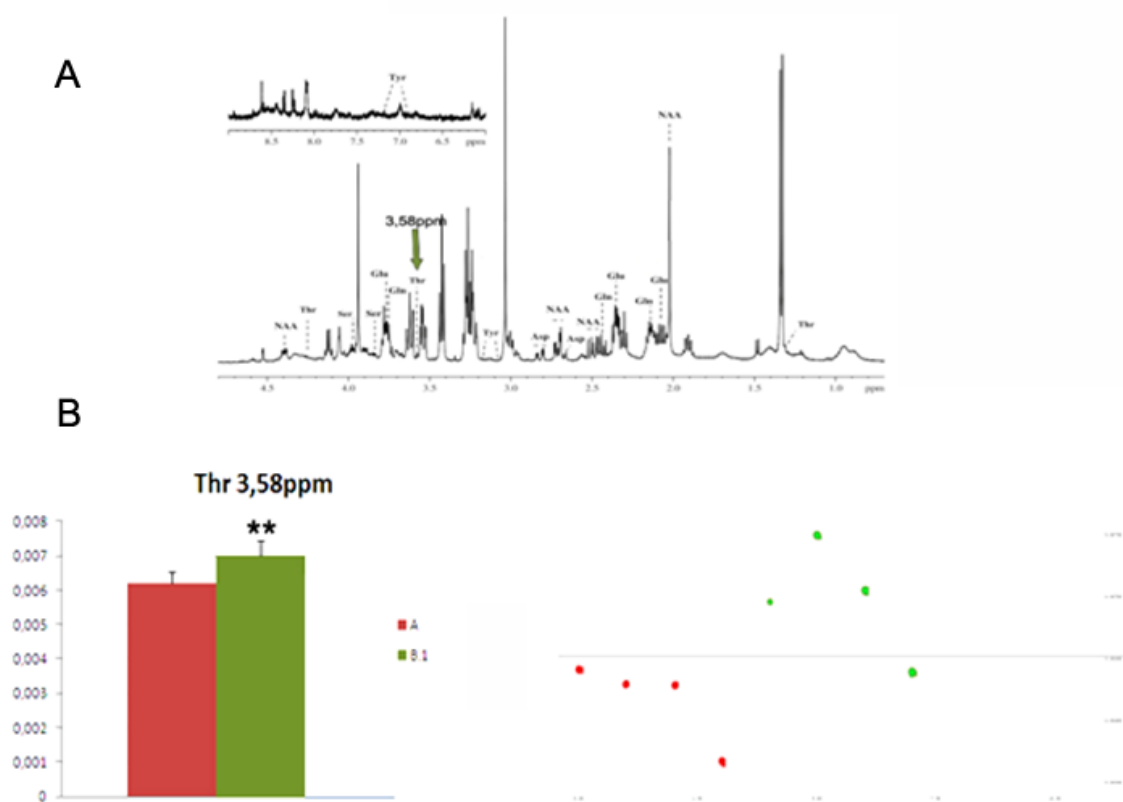


Figura 4.8A. Muestra el espectro con los distintos metabolitos bioquímicos. La flecha muestra dónde se encuentra la diferencia con respecto al grupo A. Con flecha verde se indica el punto donde se reconoce Thr 3,58 ppm. B. Muestra que los niveles de Thr 3,58ppm se encuentran aumentados significativamente en el grupo B.1 frente al grupo control isquémico. Rojo=grupo A; Verde=grupo B.1. (** $p < 0.01$).

Por otro lado, se realiza un ensayo de actividad de la SOD-1 pasadas 48 horas desde el infarto. Los datos muestran que su actividad es mayor en el grupo control

isquémico tratado con LA-419 (B.1) frente al grupo isquémico (A). Las diferencias son significativas entre el lado ipsilateral del grupo A con respecto al mismo lado del grupo B.1; y lo mismo ocurre con el lado contralateral entre ambos grupos. (Figura 4.9).

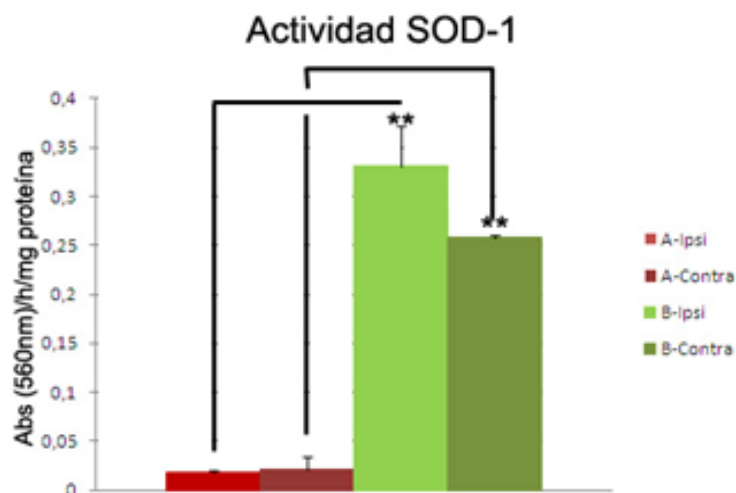


Figura 4.9. La gráfica muestra que la actividad de SOD-1 se encuentra significativamente incrementada en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1), tanto en el lado ipsilateral como contralateral, frente al grupo A. (** $p < 0.01$).

4.1.3.2. Cascada inflamatoria.

Con respecto a esta cascada inflamatoria, se ha estudiado la expresión y el marcaje inmunohistoquímico de algunos marcadores significativos implicados en la misma, como son MMP9, COX-2, Lectina de tomate o Colágeno IV pasadas 48 horas desde la pMCAO.

En cuanto al marcador inflamatorio MMP9, sus niveles son significativamente menores en el grupo isquémico tratado con LA-419 con respecto al grupo isquémico (A) al comparar sus lados ipsilaterales. Asimismo, en los lados contralaterales se observa la misma situación (Figura 4.10A). Estos datos se correlacionan con los obtenidos por medio del marcaje inmunohistoquímico, donde además de observar un menor volumen de infarto, la densidad de dicho marcaje a mayor aumento en la zona de penumbra parece menos intensa. (Figura 4.10B)

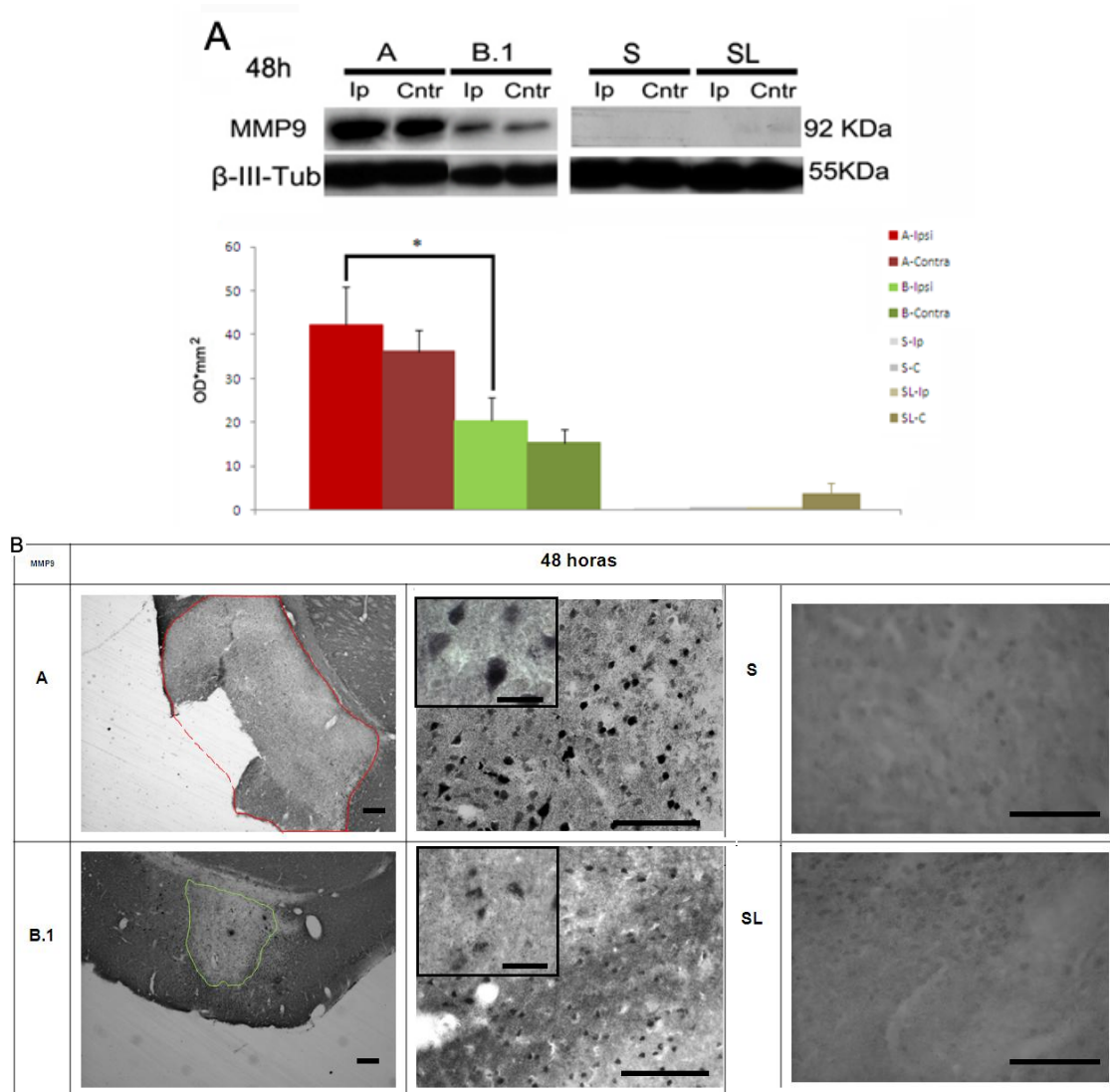


Figura 4.10A. Se muestran los resultados de expresión de MMP9 tras 48 horas, donde los niveles de este marcador inflamatorio disminuyen significativamente en el grupo B.1 respecto al grupo A entre sus lados ipsilaterales. (* $p < 0.05$). B. Muestra los volúmenes de infarto, delimitados en rojo (en el grupo isquémico) y en verde (en el grupo tratado con LA-419). El marcaje en el segundo grupo es menos intenso que en el grupo isquémico sin tratamiento (A). Mientras en los grupos S (sham) y SL (Sham+LA-419) prácticamente no se aprecia marcaje. Fotografías tomadas a 2,5x (escala 200 μ m), a 20x (escala 100 μ m) y 100x (escala 20 μ m).

Otro de los marcadores de inflamación estudiados fue la COX-2, mediante inmunohistoquímica. En este caso, los resultados del marcaje se asemejan a los obtenidos con MMP9. El grupo isquémico (A) parece tener un marcaje más intenso que el grupo isquémico al que se administró LA-419 (B.1) en la zona de penumbra, mientras en los grupos sham no se aprecia marcaje (Figura 4.11).

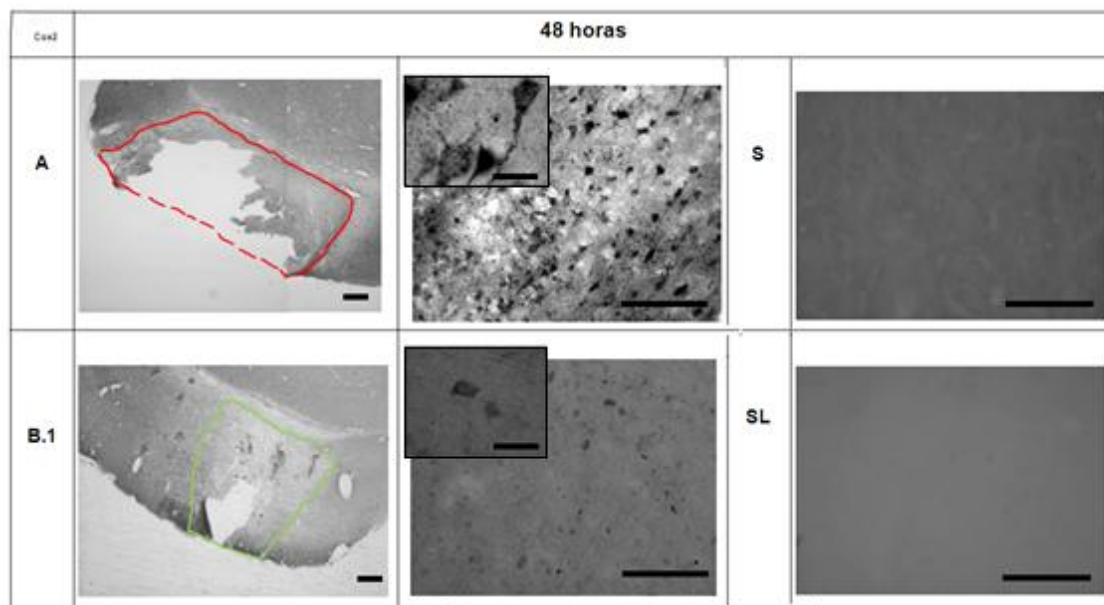


Figura 4.11. Marcaje inmunohistoquímico con COX-2 en los grupos A, B.1. Se observa un marcaje más intenso en el grupo isquémico sin tratamiento en la zona de penumbra, frente al grupo tratado con LA-419 (B.1). Mientras en los grupos S (sham) y SL (Sham+LA-419) no se aprecia marcaje. Fotografías tomadas a 2,5x (escala 200µm), a 20x (escala 100µm) y 100x (escala 20µm).

Otros de los marcadores estudiados fue la Lectina de tomate, con la que se observó microglía, además de vasos sanguíneos. Con este marcaje se vuelve a observar que el volumen de infarto es menor en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1) con respecto al grupo isquémico (A). Mientras a mayor aumento se pudo distinguir un marcaje de microglía más intenso en el segundo grupo frente al primero en la zona de penumbra; microglía que no se observa en los grupos sham. (Figura 4.12).

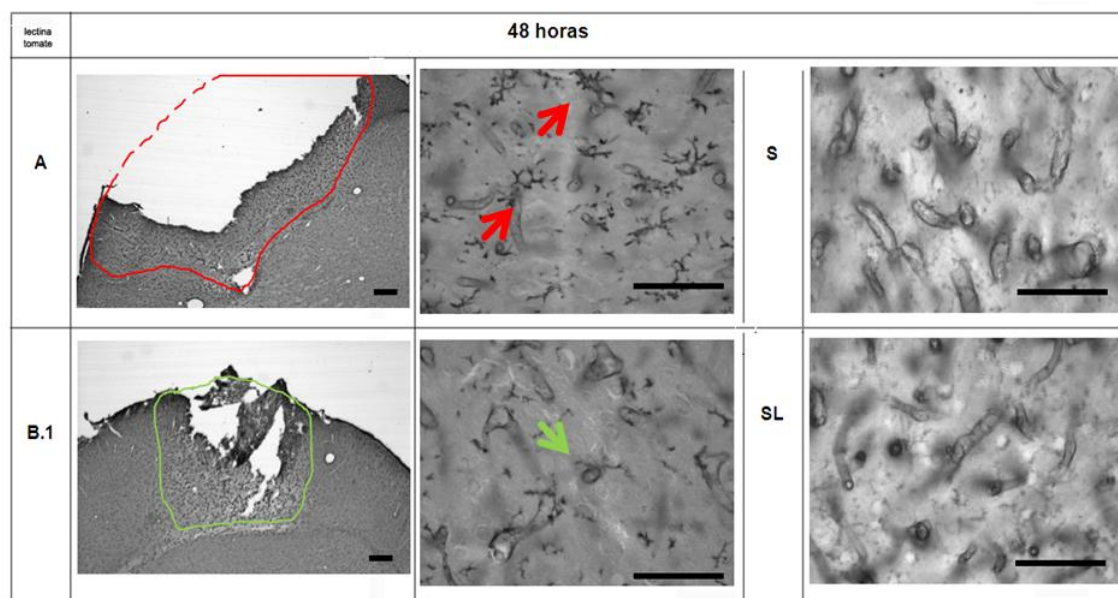


Figura 4.12. Se muestra el marcaje con Lectina de Tomate en los grupos A y B.1. Las líneas rojas o verdes delimitan la zona infartada en ambos grupos respectivamente. A un mayor aumento en la zona de penumbra se observa un mayor marcaje de la microglía en el grupo isquémico sin tratamiento (A), frente al grupo tratado con LA-419 (B.1). Las flechas rojas muestran la microglía marcada en el grupo isquémico y la flecha verde la marcada en el grupo isquémico tratado. Sin embargo en los grupos S (sham) y SL (Sham+LA-419) sólo se marcan los vasos, sin llegar a apreciarse microglía. Fotografías tomadas a 2,5x (escala 20µm) y a 40x (escala 50µm)

Uno de los marcadores afectados directamente por la cascada inflamatoria es Colágeno IV. Se estudió su marcaje inmunohistoquímico pasadas 48 horas de la pMCAO. En este caso, el grupo isquémico sin tratamiento (A) muestra un área mayor de vasos sanguíneos marcados en la zona del infarto y en la zona adyacente al mismo. Sin embargo, esta área de marcaje es inferior en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1) donde, además, el infarto es menor. En cuanto a los grupos sham, el marcaje fue escaso, reducido a la zona más externa de la corteza (Figura 4.13).

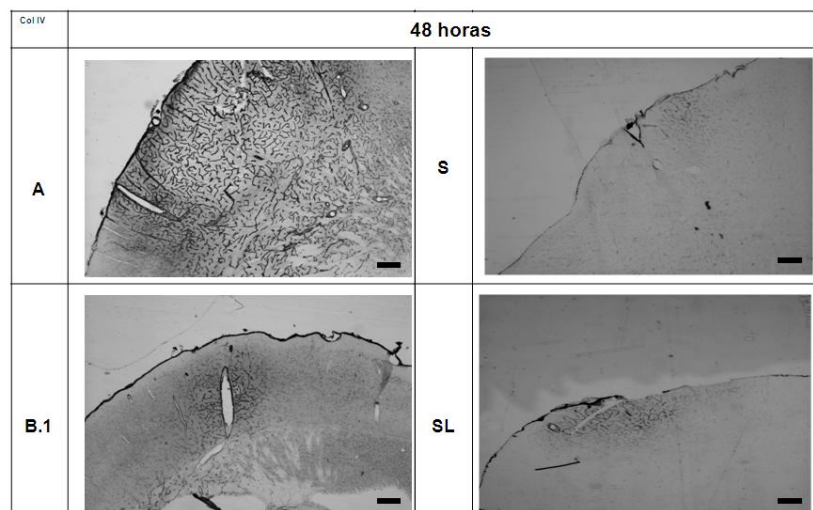


Figura 4.13. Se muestra el marcaje inmunohistoquímico con Colágeno IV en los grupos A y B.1. Se observa un área mayor de marcaje en el grupo isquémico sin tratamiento con respecto al grupo isquémico tratado (B.1) a 2,5X (escala 200 µm) a las 48 horas.

4.1.3.3. Cascada Apoptótica

En este apartado se estudiaron dos marcadores apoptóticos como son la Caspasa-3 y el Bax.

Se comenzó estudiando la actividad de Caspasa-3 pasadas las 48 horas desde la pMCAO. Dicha actividad se incrementa en el lado ipsilateral comparado con el lado contralateral en ambos grupos, aunque esta diferencia es sólo significativa dentro del grupo control isquémico. Sin embargo, el LA-419 tiende a reducir la actividad de la Caspasa-3 del grupo tratado (B.1) en el lado ipsilateral comparado con el mismo lado en el grupo A, aunque no significativamente. (Figura 4.14).

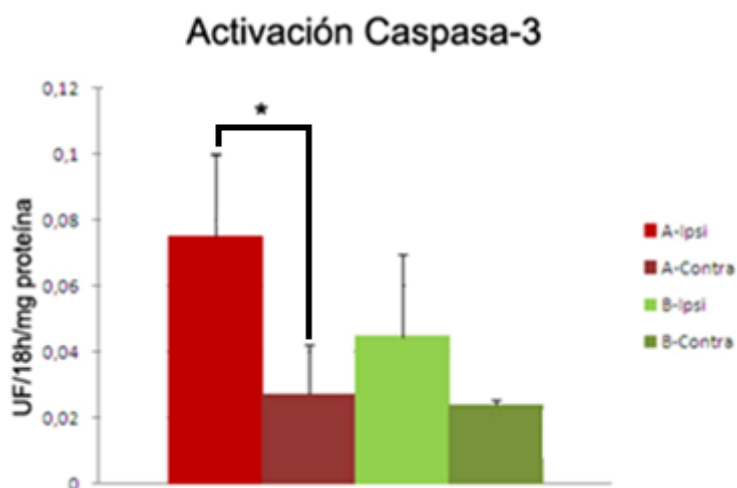


Figura 4.14. La gráfica muestra una disminución en la activación de Caspasa-3 en los lados contralaterales de los grupos A y B.1. La reducción es significativa entre el lado contralateral del grupo A frente a su lado ipsilateral. (* $p < 0.05$).

Seguidamente, se estudió el marcaje inmunohistoquímico con Bax pasadas 48 horas y 7 días desde la pMCAO. A las 48 horas el volumen del infarto era menor en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1) con respecto al grupo isquémico sin tratamiento. Al observar la zona de penumbra a mayor aumento, se observa una mayor densidad de marcaje en el segundo grupo con respecto al primero. Al continuar el estudio pasados 7 días desde que se indujo el infarto, se seguían observando las mismas diferencias entre los dos grupos. Sin embargo, en los grupos sham, el marcaje fue inapreciable tanto a las 48 h como a los 7 días en la zona periinfarto (Figura 4.15).

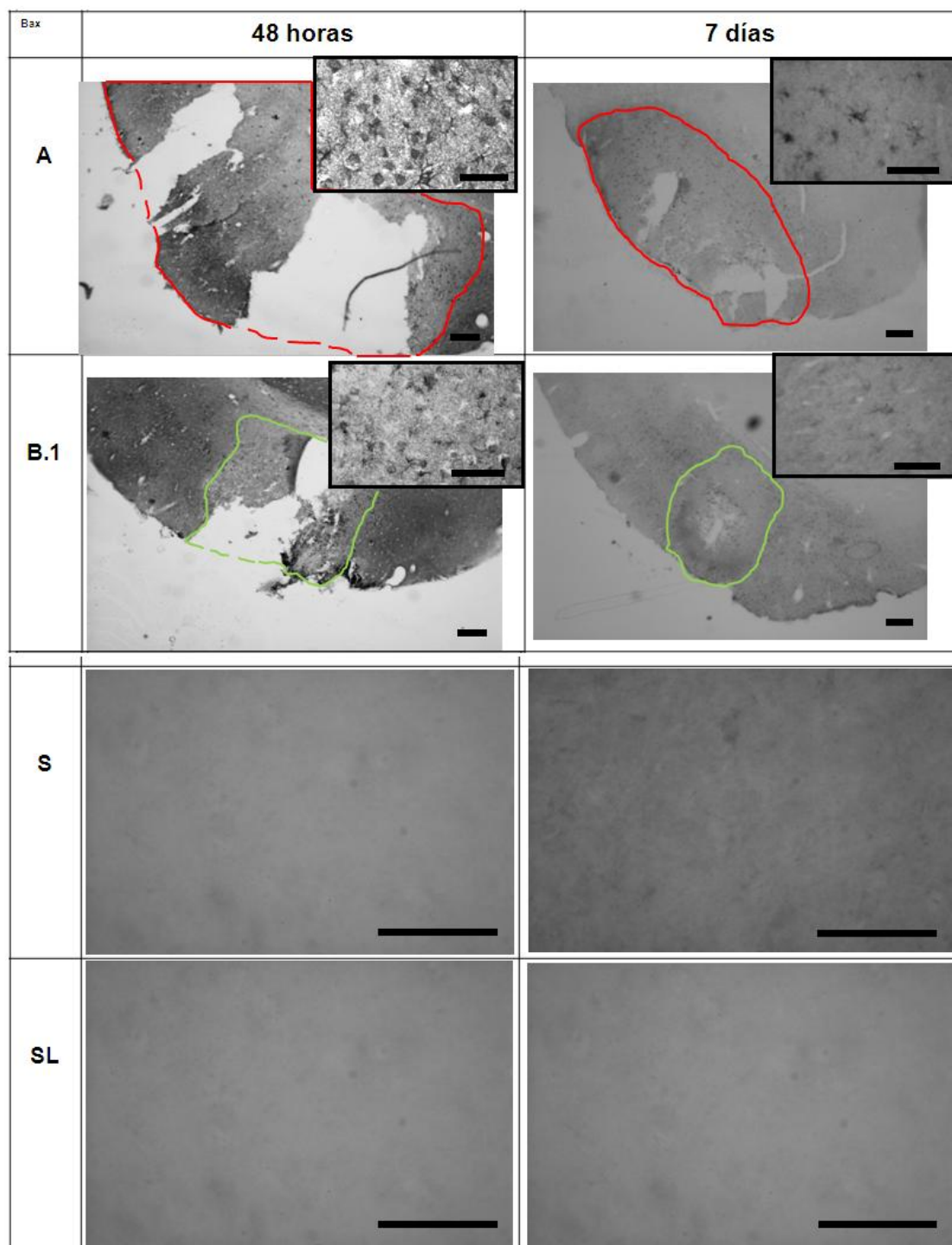


Figura 4.15. Evolución del marcaje con Bax en los grupos A y B.1. Sin embargo, en los grupos S (sham) y SL (Sham+LA-419) no se aprecia marcaje. Fotografías tomadas a 2,5x (escala 200 μ m) y a 40x (escala 50 μ m).

4.1.4. OBJETIVO 4: Estudiar el efecto del tratamiento con LA-419 sobre la reacción glial y la neuroreparación tras la pMCAO.

Para llevar a cabo este objetivo se estudiaron marcadores gliales como GFAP (astrocitos) y NG2 (oligodendrocitos), así como marcadores de proliferación como DCX (neuronas inmaduras), Ki67 y BrdU. Estos estudios se realizaron pasadas 48 horas desde la pMCAO.

En primer lugar, se estudió la expresión de GFAP tanto por Western blot como por marcaje inmunohistoquímico. Con la primera técnica se observaron niveles significativamente elevados de GFAP en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1), con respecto al grupo isquémico sin tratamiento (A). Estas diferencias eran más acusadas entre los lados ipsilaterales de ambos grupos y el sham tratado con LA-419, aunque los contralaterales tienen el mismo comportamiento al comparar los grupos (Figura 4.16A).

Al observar los marcajes inmunohistoquímicos, se volvió a observar una mayor zona infartada en el grupo isquémico sin tratamiento (A), con respecto al grupo tratado con LA-419 (B.1). Se observó además una pared astrocitaria localizada alrededor de la zona infartada en ambos grupos, teniendo una mayor área en el segundo grupo. A mayor aumento de la zona periinfarto, se observó una mayor densidad de marcaje con GFAP en el grupo isquémico tratado (B.1), así como unas estructuras filamentosas inmunorreactivas en la zona del infarto, mientras en el grupo isquémico (A) sin tratamiento la intensidad del marcaje era menor y no se observaron esos filamentos. Mientras en los grupos sham los astrocitos mantienen su morfología, encontrándose también rodeando la vasculatura. (Figura 4.16B)

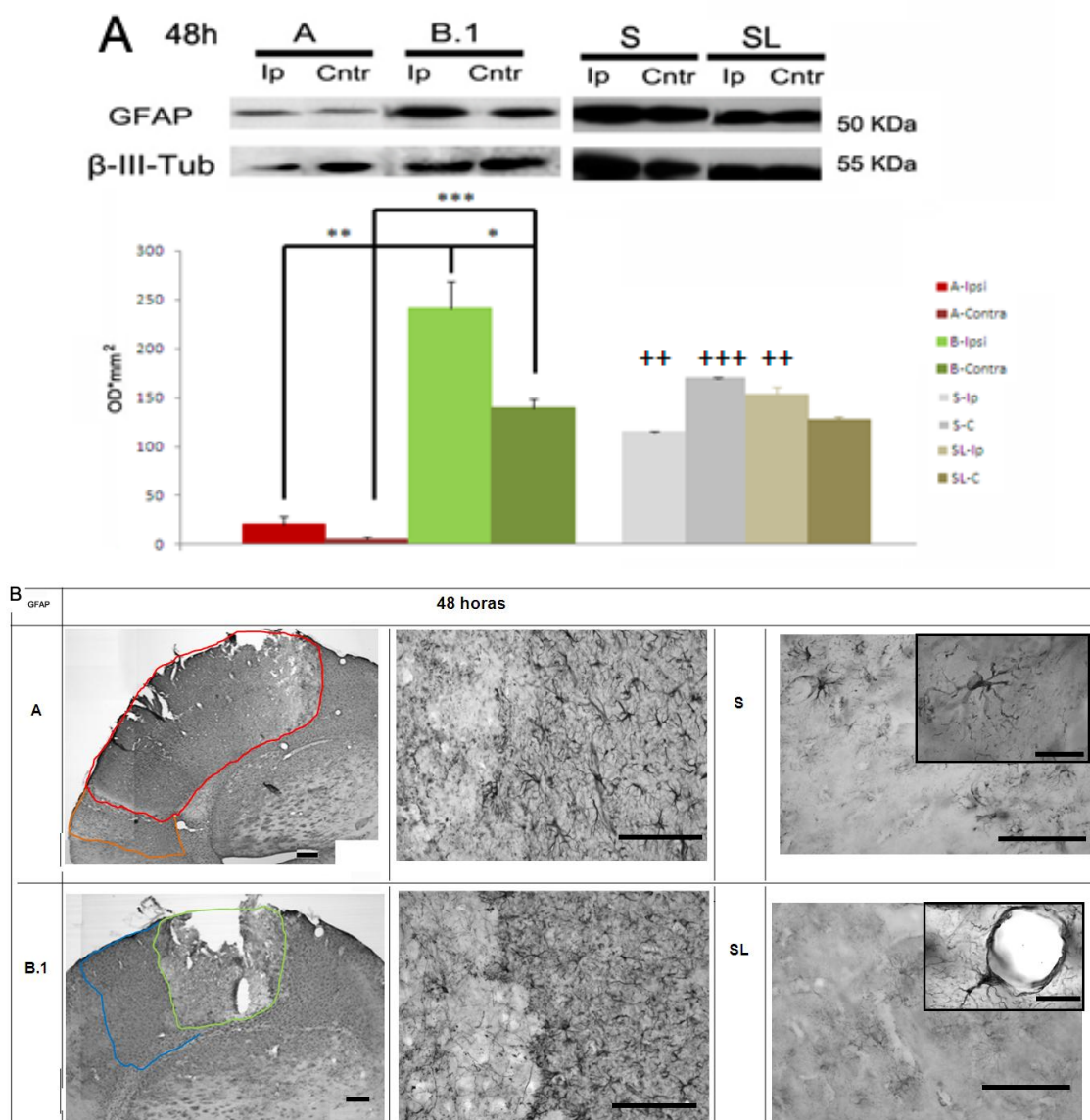


Figura 4.16A. Se muestran los resultados de expresión de GFAP pasadas 48 horas de la ligadura de la MCA. Se observan niveles significativamente elevados en el grupo isquémico tratado con LA-419, frente al grupo isquémico sin tratamiento los niveles elevados en el lado ipsilateral del grupo B.1 frente a su lado ipsilateral del grupo A. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). B. Muestra el marcaje inmunohistoquímico donde se observa una pared astrocitaria alrededor del infarto con una superficie mayor en el grupo isquémico tratado. Se observan además, estructuras filamentosas dentro de la zona de infarto. Fotografías tomadas a 2,5x (escala 200 μ m), a 20x (escala 100 μ m), y a 100x (escala 20 μ m).

Al estudiar la expresión de NG2 por marcaje inmunohistoquímico, se observó algo parecido a lo que ocurría con GFAP. Alrededor del infarto se localiza un área con un aumento en la intensidad de marcaje que parece tener un mayor área en el grupo tratado con LA-419 (B.1), frente al grupo isquémico sin tratamiento (A). Es de destacar que además se observa una hilera de oligodendroglía a través del cuerpo calloso desde la zona subventricular hacia la zona afectada por el infarto, teniendo un marcaje más intenso el grupo tratado con LA-419 (B.1), que el grupo isquémico sin tratamiento (A) (Figura 4.17).

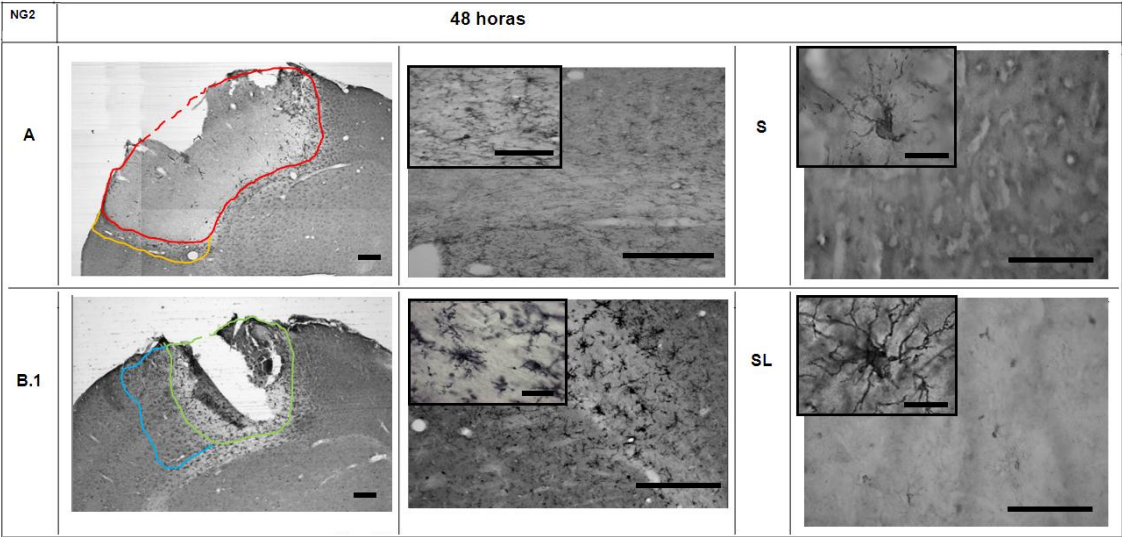


Figura 4.17. Muestra el marcaje inmunohistoquímico con NG2 pasadas 48 horas desde la pMCAO. Se observa un área con un marcaje más intenso alrededor de la zona infartada tanto en el grupo isquémico como en el isquémico tratado con LA-419, siendo mayor en este último grupo. Se observa, además un marcaje intenso a través del cuerpo calloso desde la zona subventricular hasta la zona del infarto, siendo más evidente en el grupo isquémico con tratamiento (B.1). Fotografías tomadas a 2,5x (escala 200µm), a 20x (escala 100µm) y 100x (escala 20µm).

En cuanto al marcador de neuronas inmaduras, DCX, se observó mayor intensidad del marcaje en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1). En este caso, también se volvió a observar (como ocurría con NG2) un marcaje a través del cuerpo calloso, desde la zona subventricular hacia la zona isquémica, siendo más intensa en el grupo tratado. A mayor aumento de la zona de penumbra, se notó mayor densidad de marcaje en este grupo con respecto al grupo isquémico. Mientras en los grupos sham no se apreció ese marcaje a través del cuerpo calloso ni en la zona de penumbra (Figura 4.18)

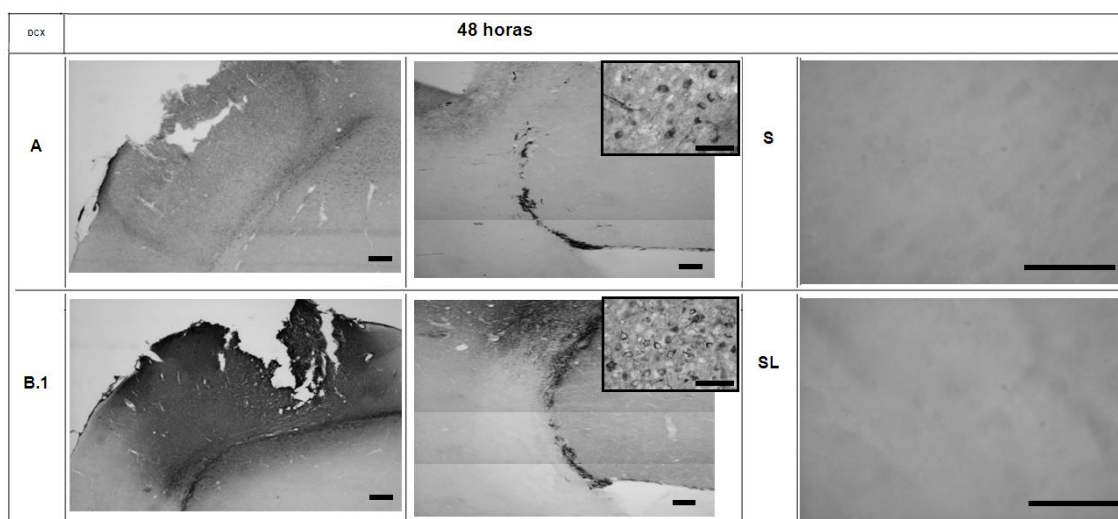


Figura 4.18. Se muestra el marcaje inmunohistoquímico con DCX pasadas 48 horas desde la pMCAO. Se observa una mayor intensidad de marcaje a través del cuerpo calloso desde la zona subventricular hacia la zona afectada por el infarto. Incluso en la zona de penumbra este aumento de intensidad se mantiene en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1). Las fotografías están tomadas con objetivo 2,5x (escala 200µm).y con40x (escala 50µm).

Finalmente, se estudiaron dos marcadores de proliferación como BrdU y Ki67. En ambos casos se observó el marcaje a través del cuerpo calloso como ocurría con DCX y NG2, desde la zona subventricular hacia la zona del infarto, siendo más intenso este marcaje en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1) (Figura 4.19A y B)

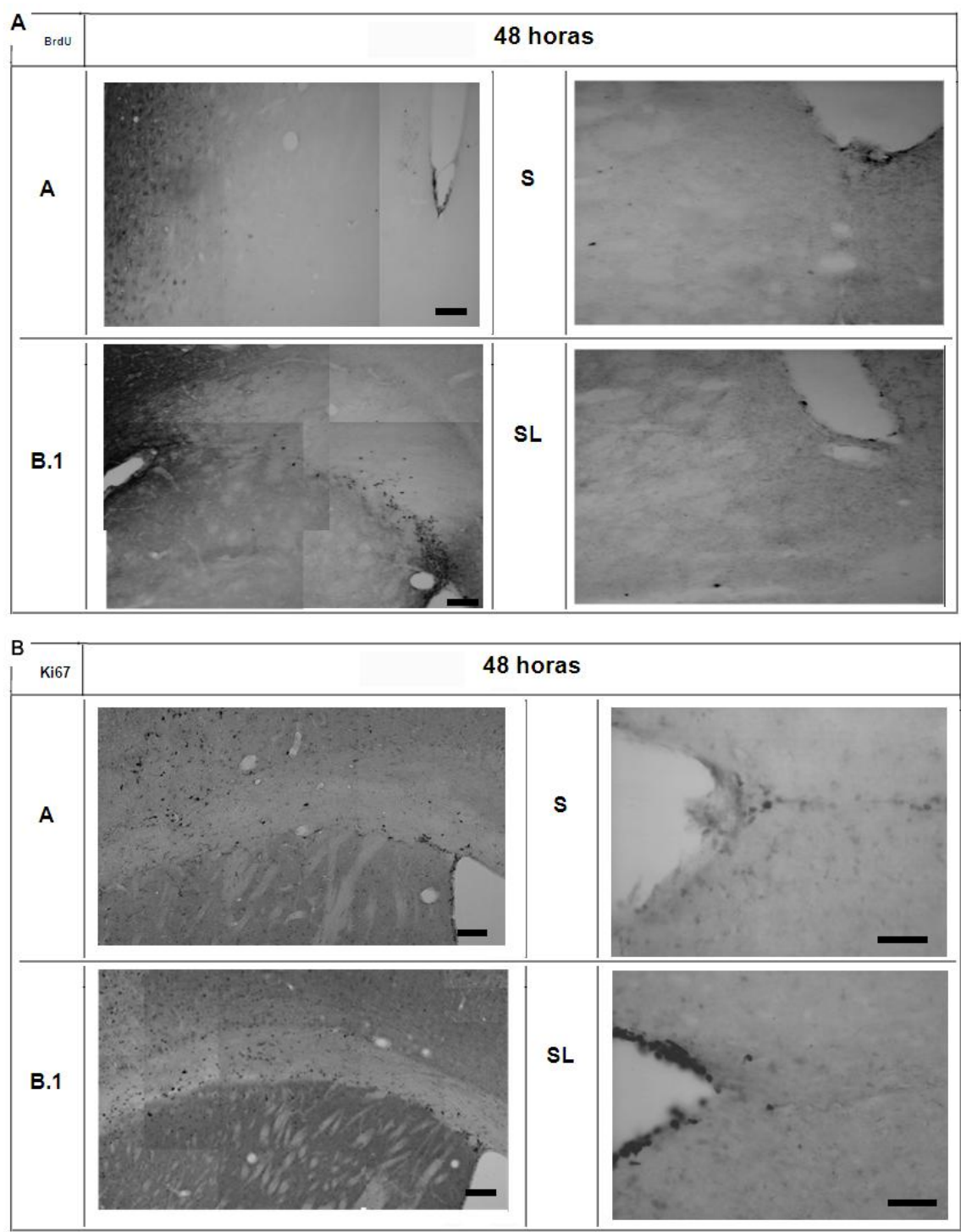


Figura 4.19. Se muestra el marcaje inmunohistoquímico con BrdU y Ki67 pasadas 48 horas desde la pMCAO. Con ambos se observa marcaje a través del cuerpo calloso desde la zona subventricular hacia la zona infartada. Este marcaje es más intenso en el grupo isquémico tratado con LA-419 (B.1). Las fotografías fueron tomadas a un aumento de 2,5x (escala 200µm) y de 20x (escala 100µm).

4.1.5. OBJETIVO 5: Estudiar la coordinación motora de los ratones isquémicos tratados con LA-419 y analizar su evolución temporal

Se comparó el tiempo que tardaba el grupo A con el grupo B.1 en distintos momentos: 6, 24, 48 horas y 7 días después del infarto. Los individuos del grupo A necesitaron más tiempo que el grupo B.1 y, los grupos sham, para llegar a alguno de los extremos, desde las 6 horas. Estas diferencias iban aumentando a las 24 horas, siendo aún más diferentes a las 48 horas, en ambos casos eran diferencias significativas. (Figura 4.20).

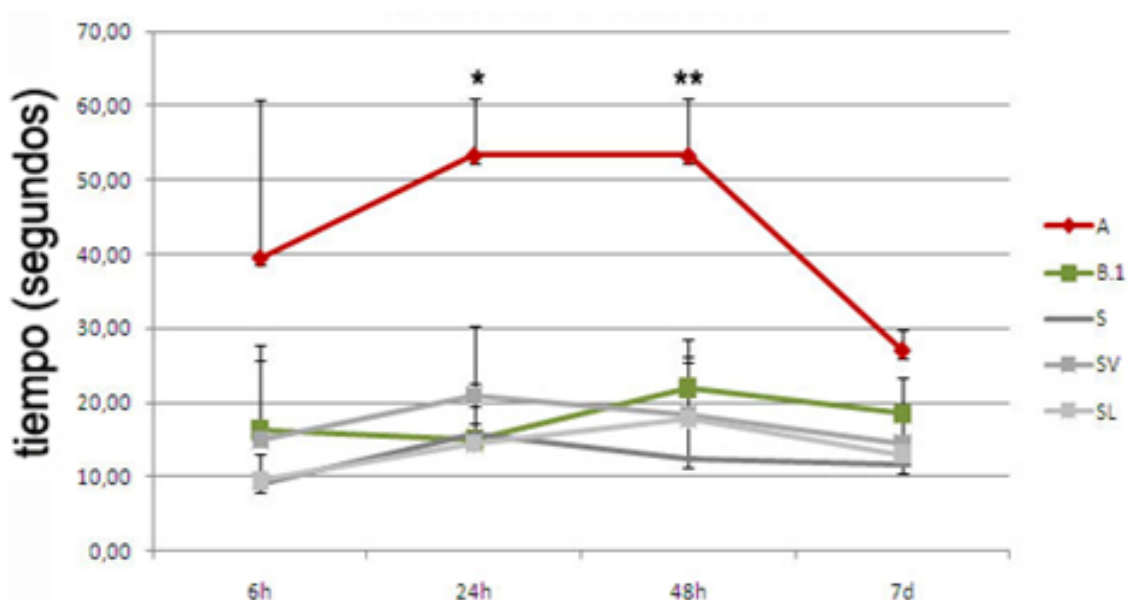


Figura 4.20. Medidas del tiempo necesario para llegar a uno de los extremos del grupo control isquémico frente al grupo tratado con LA-419 a los 15 minutos post-infarto a las 6, 24, 48 horas y 7 días después de la operación. La diferencia de tiempo empleado para llegar a uno de los extremos del grupo B.1 es cada vez más significativa. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.2. ONO-1714

4.2.1. OBJETIVO 6: Comprobar si ONO-1714 es capaz de inhibir los efectos de iNOS *in vitro* y si su administración afecta a la viabilidad celular.

La inhibición de la iNOS endógena fue analizada espectrofotométricamente usando el ensayo de Griess. Como se ha explicado anteriormente, para confirmar los efectos de ONO-1714 sobre la producción de NO, los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo estimulando macrófagos de peritoneo de ratón con LPS e INF- γ . El tratamiento con LPS (100 ng/mL) e INF- γ (100 ng/mL) incrementó la producción de NO desde el nivel basal, tras 48 horas de incubación. Cuando las células fueron tratadas simultáneamente con varias concentraciones de ONO-1714 100 mM, 10 mM, 1 mM and 0.1 mM y con LPS/ INF- γ , la producción de NO se redujo significativamente de manera dosis dependiente. Esta reducción progresiva en la concentración de nitratos en las muestras de macrófagos estaba bien correlacionada con las concentraciones de ONO-1714 (0.1, 1, 10, 100 mM) (Figura 4.21A). El coeficiente de inhibición del 50% se calculó a una concentración de 0.82 mM.

La supervivencia de los macrófagos activos de ratón fue determinada por el ensayo colorimétrico con sulforrodamina-B (SRB), una técnica rápida y eficiente además de reproducible. Es notorio que las diferentes concentraciones de ONO-1714 mantienen altos porcentajes de supervivencia con respecto al control sin tratamiento. (Figura 4.21B).

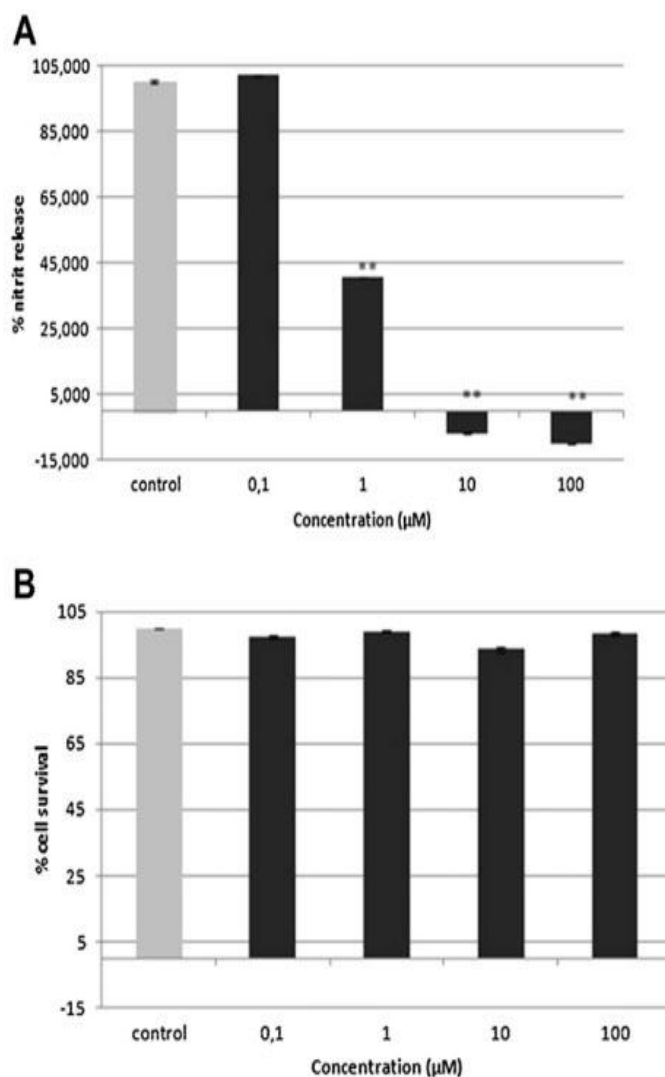


Figura 4.21.A. ONO-1714 inhibe la actividad de iNOS de macrófagos de ratón en medio de cultivo. El ensayo espectrofotométrico muestra el porcentaje de nitratos liberados por estos macrófagos activados sin tratamiento en comparación con diferentes concentraciones de ONO-1714. A: El ensayo de Griess muestra una progresiva reducción en la concentración de nitratos bien relacionada con la creciente concentración de ONO-1714 (0.1, 1, 10, 100 μM). La Concentración de inhibición al 50% se calculó en 0.82 μM . Niveles inferiores a 0.1 μM no afectan en la liberación de nitratos. Los datos son expresados en porcentaje con respecto al control sin tratamiento y representan la media con la desviación estándar. Los asteriscos muestran diferencias significativas $*p < 0.05$. B: ONO-1714 no afecta a la supervivencia celular. Los datos espectrofotométricos obtenidos con el ensayo de sulforrodamina-B, muestran la curva dosis-respuesta a nivel de supervivencia de los macrófagos tratados con diferentes concentraciones de ONO-1714. Los porcentajes (media con desviación estándar) son calculados con respecto al control sin tratamiento.

4.2.2. OBJETIVO 7: Analizar si la administración crónica de ONO-1714 es capaz de reducir el volumen de infarto tras la pMCAO en el ratón.

Los animales eran sometidos a una isquemia focal por pMCAO. Tras 48 horas eran sacrificados, extrayendo su cerebro en fresco y tiñéndolo con TTC para determinar la zona de infarto en rodajas coronales. El volumen de infarto era mayor en el grupo control tratado con el vehículo comparado con el grupo tratado de forma crónica con ONO-1714 (Figura 4.22). El volumen de cerebro afectado en el grupo control era de 4.17 mm^3 comparado con el grupo tratado (0.2 mm^3) donde la tinción era mínima, por debajo del límite de detección de la técnica.

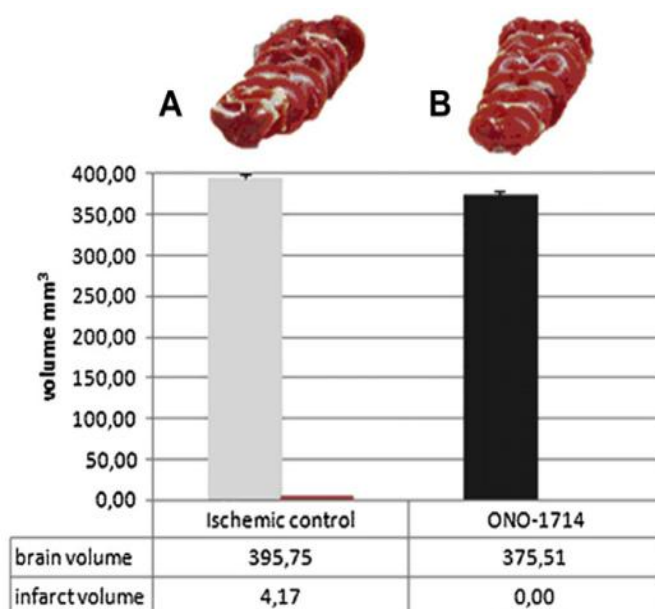


Figura 4.22. El tratamiento crónico con ONO-1714 reduce el volumen de infarto después de la ligadura permanente de la rama frontal de la MCA en ratón. Los ratones eran sacrificados 48 horas después de la cirugía, los volúmenes del cerebro y la región afectada era analizada con la tinción de TTC en rodajas coronales seriadas. La figura muestra una serie de secciones representativa de cada grupo: el control con vehículo (A) y el tratado con ONO-1714 (B). No hay diferencias en el tamaño del cerebro entre ambos grupos. Sin embargo, en el grupo isquémico tratado con el vehículo la zona infartada (sin teñir) en el neocórtex es mayor comparada con el grupo tratado. Los datos son la media con la desviación estándar (* $p < 0.05$).

5.DISCUSIÓN

Debido a la alta incidencia del infarto cerebral entre la población y por su importancia, cada 29 de Octubre se celebra el Día Mundial del Ictus.

Distintos laboratorios centran sus investigaciones en conocer más en profundidad los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad para descubrir una estrategia terapéutica, ya sea a nivel de neuroprotección o neurorreparación, con sistemas que puedan intervenir en diferentes puntos de la cascada isquémica. Como ya se ha explicado en el apartado de Introducción, en la actualidad y desde hace casi dos décadas, el único fármaco aprobado en el tratamiento del ictus es el activador tisular de plasminógeno recombinante (r-tPA), aunque no es eficaz en todos los pacientes, tiene limitaciones temporales en su administración y en algunos casos se muestran efectos secundarios adversos en el parénquima cerebral, incluyendo inflamación, excitotoxicidad y degradación de la lámina basal, con lo que, menos del 5% de los pacientes se puede beneficiar de este tratamiento (Castellanos et al., 2007; Lloyd-Jones et al., 2010; Neumann-Haefelin et al., 2002; Yang and Rosenberg, 2011; Rodriguez-Gonzalez et al., 2011a). Es necesario, por ello, encontrar nuevos fármacos que puedan disminuir o aliviar el daño que ocurre tras un ictus. Este estudio se ha centrado en analizar los efectos de dos compuestos, LA-419 y ONO-1714, tras un modelo de isquemia en ratón mediante pMCAO, modelo que se aproxima en gran medida a lo que ocurre en humanos.

5.1. LA-419

El compuesto LA-419 es un novedoso donador de NO, con demostrados efectos antiarterioescleróticos, antiinflamatorios, antioxidantes y antitrombóticos, útil en el tratamiento de infartos de miocardio, con la particularidad de no modificar la presión arterial (Hernandez et al., 2005; Porras et al., 2008; Salas E and Badimon L, 2006; Vilahur et al., 2004; Pena et al., 2011).

Los estudios mostrados en este trabajo demuestran que el tratamiento con LA-419, tras la oclusión permanente de la Arteria Cerebral Media en ratones, es capaz de disminuir el volumen del infarto. Estos estudios confirman resultados de trabajos previos del laboratorio en un modelo de isquemia global por hipoxia (Serrano et al., 2007) y en un modelo focal tras administración del péptido vasoconstrictor Endotelina-1 en el estriado mediante técnica estereotáxica (Martinez-Murillo et al., 2007).

5.1.1. OBJETIVO 1: Comprobar si existe reducción del volumen de infarto y en qué tiempo es mayor esa reducción por la administración de LA-419, tras pMCAO en el ratón.

La administración de LA-419, 15 minutos después del infarto, reduce significativamente el volumen del mismo ($p < 0.001$), pasadas 48 horas desde la operación, hasta, incluso, ser el área de infarto inapreciable con ayuda de la técnica de TTC. Aumentando el tiempo de administración hasta los 30 minutos post-infarto, el volumen de infarto resultante sigue disminuyendo significativamente ($p < 0.05$) al compararse con el grupo isquémico control sin tratamiento.

Estos resultados se complementan con otros obtenidos mediante un tratamiento de LA-419 de un modo crónico frente la isquemia focal permanente en ratón. Estos resultados iniciales demuestran que la administración subcutánea del fármaco durante un periodo de tiempo anterior a una isquemia focal permanente (que puede ser como medida de prevención) y su uso diario posterior, también contribuye a la disminución del volumen de infarto (artículo en preparación).

Estos datos del tratamiento con LA-419 de forma aguda post-infarto se correlacionan con los obtenidos en la prueba de comportamiento para comprobar el vigor muscular. El grupo isquémico tratado con LA-419 a los 15 minutos, reduce el tiempo significativamente en llegar a uno de los extremos de la cuerda tirante, si se compara con el grupo control isquémico sin tratamiento. El grupo tratado con LA-419 a los 30 minutos sigue obteniendo tiempos significativamente menores al grupo isquémico sin tratamiento, aunque superiores al grupo isquémico tratado a los 15 minutos. Este aumento en el volumen de infarto puede deberse a que cuanto más se tarde en tratar la zona afectada, mayor es el daño provocado por la reperusión. Esto se conoce como el “daño cerebral por reperusión” donde se encuentran involucrados el aumento de citoquinas y radicales libres de oxígeno, adhesión leucocitaria y mayor desestabilización de la barrera hematoencefálica (Jie Pan et al., 2007).

A la vista de estos resultados, en los experimentos posteriores se administró LA-419 pasados 15 minutos desde el ictus. Cuando se analizan los volúmenes de infarto por una técnica más sensible y sin necesidad de sacrificar los animales, como es la Resonancia Magnética Nuclear, 24 horas después de la isquemia, se observa que tanto el porcentaje de edema vascular, como el porcentaje de edema citotóxico, se encuentran significativamente reducidos ($p < 0.05$) en el grupo tratado con LA-419,

frente al grupo control isquémico. Con lo cual, la administración de LA-419 a este tiempo tiene efectos beneficiosos en la reducción de la zona infartada al ocurrir una isquemia focal por ligadura permanente de la MCA en ratón.

5.1.2. OBJETIVO 2: Estudiar la vía de actuación de LA-419 para la regulación del sistema NOS.

En cuanto al proceso de actuación del LA-419, estudios previos concluyeron que puede actuar aumentando la producción de NO al restablecer los niveles de eNOS al mediar en la normalización de esta isoforma con su regulador alostérico, Hsp90, en modelos de hipertrofia cardíaca (Ruiz-Hurtado et al., 2007). En el modelo de pMCAO se ha comprobado, en este estudio, que tras un tratamiento con LA-419 a los 15 minutos post-infarto, los niveles de expresión génica de eNOS, por qRT-PCR, se encuentran significativamente más elevados en el lado ipsilateral frente al lado contralateral. Este mismo comportamiento tiene el grupo isquémico sin tratamiento, aunque la diferencia entre ambos lados no es significativa. Sin embargo, la diferencia significativa se encuentra al comparar los lados ipsilaterales de ambos grupos. Entonces se observa que la expresión de eNOS es significativamente mayor en el grupo isquémico tratado con LA-419 frente al grupo isquémico sin tratamiento. Con lo cual la administración de LA-419 sería capaz de modular los niveles de esta isoforma endotelial, favoreciendo desde un primer momento, estudio realizado a las 6 horas post-infarto, la vasodilatación.

Con respecto a la isoforma nNOS, los niveles de expresión génica estudiados por qRT-PCR 6 horas después de la pMCAO, se encuentran significativamente más elevados en el lado ipsilateral del grupo isquémico frente al mismo lado del grupo tratado con LA-419 15 minutos después del infarto. Pasadas 24 horas desde el infarto, la concentración de nNOS analizada por Western blot es mayor en el grupo tratado con LA-419. Al estudiar su marcaje por inmunohistoquímica, se observa que en el grupo isquémico sin tratamiento las neuronas que expresan nNOS se encuentran vacuolizadas como síntoma de su degeneración, mientras en el grupo tratado con LA-419, las neuronas que se marcan conservan una morfología normal. Se ha comprobado que en la isquemia, los elevados niveles de NO durante prolongados espacios temporales por la isoforma neuronal actúa como una fuente de neurotoxicidad (Eliasson et al., 1999), pero que al igual que ocurre con la eNOS, la producción de niveles controlados de NO por parte de la nNOS podría resultar

beneficiosa al estar implicada en la regulación del tono vascular (Narbeh Melikian et al., 2009).

Al observar que el sistema de las NOS se encuentra afectado por el tratamiento con LA-419, se ha decidido estudiar si este compuesto es capaz de regular la activación de eNOS e incluso nNOS a través de una ruta alternativa a los niveles de Calcio, como son Hsp90 o Akt.

En lo referente a los niveles de Hsp90 por Western-blot, se observa que son significativamente mayores en el grupo tratado con LA-419 tanto en el lado ipsilateral como contralateral, pasadas 24 horas desde el infarto. Esto sugiere que Hsp90 podría estar interaccionando con eNOS producido en esa zona y regulando el daño (Garcia-Cardena et al., 1998). Además podría estar mediando en los niveles de expresión de nNOS (Zhou L and Zhu DY, 2009), ya que se ha visto que en este mismo tiempo, sus niveles están aumentados por igual en el grupo tratado con LA-419.

Como se ha explicado en la introducción, otra forma de activar la isoforma eNOS es mediante su fosforilación por Akt en el residuo Ser-1177. Se consigue así un incremento de su actividad y con ello una mayor producción de NO a nivel endotelial que favorece la disminución del infarto (Dimmeler et al., 1999; Forstermann et al., 1994; Fulton et al., 1999; Roviezzo et al., 2007). A su vez, Akt necesita fosforilarse en su residuo Thr-308 para activarse (Sarbasov et al., 2005), es por esto que la proteína estudiada por Western blot fue la forma fosforilada. Con esto, se observa un aumento en el grupo tratado frente al grupo control isquémico, siendo significativo en el lado contralateral (mismo lado en el que se encuentran aumentados los niveles de Hsp90 a ese tiempo) lo que podría estar produciendo efectos compensatorios, aunque no existen diferencias significativas entre el aumento de este marcador entre el lado ipsilateral y contralateral del grupo isquémico tratado. Estos datos sugieren que encontrar mayores niveles de Akt, regularía positivamente la actividad de eNOS únicamente, sin afectar la actividad de iNOS (Fulton et al., 1999). Y la activación de esta isoforma endotelial se encuentra apoyada por los elevados niveles de Hsp90, en el lado contralateral, que puede estar compensando los daños del infarto. Asimismo, llama la atención el aumento de los niveles de Akt en el grupo sham al que se ha inyectado LA-419. Esto hace suponer que LA-419 está directamente implicado en la regulación de la activación de Akt.

En cuanto a la isoforma inducible de NOS, su activación es independiente de los niveles de Calcio, Hsp90 y Akt. Sin embargo se activa en procesos de inflamación incrementando los niveles de NO, lo que favorece el progreso de la neurodegeneración, al inducir apoptosis (Moro et al., 1998; Rossig et al., 2000). Al estudiar tanto su expresión génica a las 6 horas post-infarto, como su expresión proteica pasadas 24 horas desde el infarto, se observa que ambas se encuentran disminuidas en el grupo tratado con LA-419 frente al grupo isquémico. En la expresión proteica esta diferencia es significativa al comparar los lados contralaterales entre el grupo isquémico tratado y sin tratamiento, lo que podría traducirse en una disminución del daño cerebral global al tratar al grupo isquémico con LA-419. Además, los resultados inmunohistoquímicos revelan que está localizado también en células piramidales en la zona alrededor del infarto, que parece intensificarse en el grupo isquémico sin tratamiento. Los menores niveles de iNOS en el grupo isquémico tratado con LA-419 sugieren que el daño producido por esta isoforma es menor que en el grupo isquémico sin tratamiento, donde esta expresión de iNOS seguiría produciendo NO aumentando el daño (Moro et al., 1998).

Los datos de todos estos experimentos se complementan con los obtenidos por el equipo investigador anteriormente, tal y como se ha mencionado en otros apartados de esta Tesis. Por un lado, la administración oral de LA-419 previa, en un modelo de isquemia global con reperusión en ratas, produjo disminuciones en los niveles de iNOS (Serrano et al., 2007). Por otro lado, la administración por vía intraperitoneal de este fármaco en un modelo de isquemia focal provocado con endotelina-1 en ratas reportó esta misma disminución (Martinez-Murillo et al., 2007).

5.1.3. OBJETIVO 3: Analizar los cambios de expresión de distintos marcadores de las cascadas isquémica, inflamatoria y apoptótica.

Los resultados anteriores de expresión proteica de iNOS se correlacionan con los obtenidos por histoquímica cuando se realiza un marcaje con Lectina de tomate para observar microglía. Ésta está involucrada en la vigilancia inmune (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005) y podría contribuir al daño tisular por la producción de citoquinas y radicales libres de oxígeno (Banati et al., 1993; Lees, 1993) al ser capaz de producir NO a través de la iNOS. Sin embargo, en el grupo tratado con LA-419 casi no se encuentra marcaje microglial en la zona periinfarto a diferencia del grupo isquémico sin tratamiento donde este marcaje es más evidente, sino que se encuentra

microglía dentro del infarto que podría estar encargándose de recibir y propagar las señales inflamatorias, como forma de protección en el grupo isquémico tratado con LA-419 (Lippoldt et al., 2005).

Además, altos niveles de NO son capaces de producir altos niveles de radicales libres de oxígeno que unido a la peroxidación lipídica provocan un alto estrés oxidativo, lo cual tiene un papel importante en el daño isquémico (Love, 1999). Por ello, se estudiaron los niveles de SOD-1, enzima que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, convirtiéndose así, en una importante defensa antioxidante. Sus niveles de actividad a las 48 horas del infarto, fueron significativamente mayores dentro de la corteza, tanto de la zona ipsilateral como contralateral, en el grupo tratado con LA-419, frente al grupo isquémico sin tratamiento. Esto sugiere que LA-419 induciría efectos antiinflamatorios y antioxidantes donde estos elevados niveles de SOD-1 estarían disminuyendo la concentración de radicales libres producidos como consecuencia de la isquemia.

La cascada isquémica se ve alimentada por la cascada inflamatoria que ocurre simultáneamente, en la que se destacan marcadores como MMP9 y COX-2. En cuanto a MMP9, a las 48 horas del pMCAO, los niveles de proteína observados por Western blot son mayores en el grupo isquémico sin tratamiento frente al grupo isquémico tratado con LA-419, tanto en el lado ipsilateral, donde se produjo la lesión, como en el contralateral. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos mediante inmunohistoquímica, donde se aprecia un marcaje más intenso en el grupo sin tratamiento frente al grupo tratado con LA-419. El aumento de MMP9 puede ser responsable de la desestabilización inicial de la barrera hematoencefálica, pudiendo atacar sustratos como parte de una respuesta neuroinflamatoria (Fujimura et al., 1999; Rosenberg et al., 1998).

Esta desestabilización de la BHE por MMP9 desemboca en un edema vasogénico, así como en la degradación del colágeno tipo IV sintetizado por células endoteliales, desestructurando los vasos sanguíneos (Fujimura et al., 1999). Así, el marcaje inmunohistoquímico con Colágeno IV, muestra que la superficie afectada es mayor en el grupo control isquémico que en el grupo tratado con LA-419 15 minutos después del infarto.

Por otro lado, el estudio inmunohistoquímico de COX-2 revela que en el grupo isquémico tratado con LA-419 parece tener menor intensidad de marcaje en la zona de

penumbra en comparación con el grupo isquémico sin tratamiento. Esto es beneficioso puesto que la activación de COX-2 contribuye a la sobreproducción de superóxidos que incrementan los efectos nocivos en la isquemia (Miettinen et al., 1997; Siesjö BK, 1994).

A su vez, se desencadena una cascada apoptótica resultado final de las cascadas isquémica e inflamatoria. En ella intervienen Bax y Caspasa-3. La primera es una proteína que estimula la apertura de poros de membrana mitocondriales induciendo apoptosis (Tsujimoto, 2002). Pasadas 48 horas desde la isquemia, el marcaje inmunohistoquímico revela que Bax se sitúa en la zona alrededor del infarto tanto en el grupo isquémico como en el grupo isquémico tratado con LA-419. Sin embargo, la intensidad del marcaje de Bax se va reduciendo, desde las 48 horas, hasta llegar a ser inapreciable pasada una semana desde el infarto, en el grupo tratado con LA-419, lo que ocurre menos notablemente en el grupo isquémico. Esto revelaría que la apoptosis al menos se mantiene en este segundo grupo. En cuanto a la activación de Caspasa-3 muestra una tendencia a disminuir en el grupo tratado con LA-419 con respecto al grupo isquémico pasadas 48 horas desde el infarto, lo que significaría una disminución del daño por apoptosis en la zona de penumbra, al igual que ocurre en el lado contralateral a la lesión, del grupo isquémico sin tratamiento. Además, estudios recientes sugieren que la Caspasa-3 está relacionada con la disminución de la fosforilación de Akt (evitando su activación) y que la inhibición de este marcador apoptótico podría ayudar a promover la neurogénesis después de un infarto (Fan et al., 2014).

Además, los altos niveles de Treonina observados por HRMAS, sugerirían que, como precursor de GABA, podría estar ayudando a paliar el daño del ictus mediante su actividad inhibitoria, contrarrestando los efectos de la alta liberación de glutamato (Gusev E and Skvortsova V, 2003). En las primeras horas del mismo (resultados obtenidos pasadas 24 horas desde el infarto), mientras que una inhibición mantenida por este neurotransmisor podría tener efectos negativos en la neurorreparación posterior (Clarkson AN et al., 2010).

5.1.4. OBJETIVO 4: Estudiar el efecto del tratamiento con LA-419 sobre la reacción glial y la neuroreparación tras la pMCAO.

El componente glial también se encuentra afectado tras una isquemia cerebral, teniendo mucha importancia su presencia y función en el desarrollo de la lesión y en la propia reparación del tejido (Cesario V.Borlongan et al., 2000b; Ransom and Sontheimer, 1992). Los niveles de GFAP, analizados por Western blot, se encuentran significativamente aumentados en el lado ipsilateral y contralateral en el grupo isquémico tratado con LA-419 frente al grupo control isquémico, a las 48 horas desde el infarto. Por la técnica inmunohistoquímica, se observa un aumento en la densidad de marcaje alrededor de la zona infartada, que tiene una mayor área en el grupo tratado con LA-419, además se nota que aparecen fibras inmunorreactivas dentro de la zona del infarto, algo que no ocurre en el grupo isquémico sin tratamiento. Asimismo, los grupos sham presentan una expresión y morfología igual a la del individuo sano. Distintos estudios han demostrado que en primera instancia, la glía reactiva forma una barrera alrededor de las zonas dañadas como forma de protección frente al tejido sano circundante a la lesión, aumentan la permeabilidad vascular y desarrollan otras funciones como son la de comportarse como almacenes de glucógeno defendiendo al cerebro del daño hipoglucémico, minimizando la acción excitotóxica de neurotransmisores como el glutamato y favoreciendo la eliminación de moléculas dañinas a través de las redes de uniones estrechas (Ijichi et al., 1995; Renault-Mihara et al., 2008; Voskuhl et al., 2009; Rossi et al., 2007). Asimismo, los procesos gliales encontrados dentro de la zona infartada podrían ayudar en la posterior recuperación de la misma atrayendo nuevas células hacia esa zona induciendo neuroreparación (Cesario V.Borlongan et al., 2000a).

Por su parte, al estudiar inmunohistoquímicamente las células progenitoras de oligodendrocitos marcadas con NG2, se observa que al igual que ocurre con GFAP, se encuentra mayor densidad de marcaje alrededor de la zona infartada en el grupo isquémico tratado con LA-419. Además, llama la atención el marcaje de NG2 a través del cuerpo calloso desde la zona subventricular hacia la zona de la isquemia, siendo más intenso en este grupo con respecto al grupo isquémico sin tratamiento. Este aumento de oligodendrocitos en el grupo tratado con LA-419 podría ser beneficioso, ya que este tipo glial puede inducir mecanismos de reparación (Claus et al., 2013). Por su parte, este marcaje a través del cuerpo calloso no es detectado en los grupos sham.

Se han estudiado también otros marcadores para ver si el tratamiento con LA-419 tiene entre sus efectos estimular la neuroreparación tras el infarto. En un cerebro

adulto, existe neurogénesis en dos regiones, la zona subventricular (ZSV) localizada en los ventrículos laterales que producen nuevas interneuronas y en la zona subgranular del giro dentado (GD) que genera nuevas células granulares. Incluso, después de un infarto cerebral, el propio individuo adulto tiene una capacidad limitada de “auto-reparación”, aunque aún se conoce poco sobre este proceso (Kokaia and Lindvall, 2003a; Lindvall and Kokaia, 2010). Los marcadores estudiados para este fin han sido BrdU (análogo a la timidina y que se incorpora en el ADN de las células en división), Ki67 (proteína del ciclo celular que se expresa en células que se encuentran en proliferación) y DCX (presente en neuronas inmaduras y en neuroblastos en migración) (Lu et al., 2005). Pasadas 48 horas desde el infarto, la detección inmunohistoquímica con Ki67 revela un marcaje celular a través del cuerpo calloso desde la zona subventricular hacia la zona del infarto, que se correlaciona con los resultados obtenidos con BrdU. Este marcaje parece ser más intenso en el grupo isquémico con tratamiento. Estos resultados parecen indicar, que LA-419 está potenciando ese efecto de “auto-reparación” que como se ha explicado antes, tienen los individuos adultos tras un ictus (Beck and Plate, 2009). A estos datos se añaden los obtenidos con DCX, que muestran un resultado similar al obtenido por Ki67, donde vuelve a observarse un marcaje a través del cuerpo calloso de estas neuronas inmaduras que podrían estar promoviendo la neuroreparación. A su vez, a mayor aumento en la zona de penumbra se observa mayor intensidad de marcaje en el grupo isquémico tratado con LA-419.

5.1.5. OBJETIVO 5: Estudiar la coordinación motora de los ratones isquémicos tratados con LA-419 y analizar su evolución temporal.

Finalmente, como se ha explicado en la introducción, en pacientes humanos, se ha observado una recuperación funcional mayor o menor en un tiempo superior a seis meses desde que ocurriera el ictus. Por ello, es importante, no sólo realizar prueba bioquímicas, sino además valorar por pruebas de comportamiento, la recuperación de los animales. En base a esto, se han realizado test de comportamiento a distintos tiempos, para comprobar una evolución temporal de la coordinación motora y estudiar si el tratamiento con LA-419 tras una pMCAO aumenta esta mejoría.

En cuanto a la coordinación motora, se ha observado que, 6 horas después del infarto, el grupo isquémico sin tratamiento y el grupo isquémico tratado con LA-419 pasados 15 minutos del infarto no tienen diferencias significativas en el tiempo que tardan hasta alcanzar uno de los extremos de la cuerda, aunque el segundo grupo

tiende a tardar menos. Sin embargo, estas diferencias temporales se incrementan significativamente a las 24 horas y aún más a las 48 h, donde el grupo control sin tratamiento cada vez tarda más en alcanzar un extremo, mientras el grupo tratado prácticamente no tiene cambios. Esto puede deberse a que el volumen de corteza motora afectada es menor en el segundo grupo que en el primero, donde la isquemia no está controlada y sigue evolucionando fisiopatológicamente. En cambio, los tiempos a los 7 días del infarto tienden a estabilizarse sin tener diferencias significativas, posiblemente porque haya mecanismos que por otras vías compensen este déficit motor.

Estos resultados hacen especular sobre la posibilidad de que el tratamiento con LA-419 podría mejorar los procesos de neurorreparación derivados de la plasticidad neuronal. Esta posibilidad de neurorreparación que ha sido observada por inmunomarcaje tanto de marcadores gliales como NG2 y GFAP, de neuroblastos (DCX) como de proliferación, (BrdU o Ki67) hacia la zona infartada.

Asimismo, se puede afirmar que el tratamiento con LA-419, 15 minutos después de un infarto cerebral focal por oclusión en ratón, parece aminorar los daños producidos por la isquemia a la vez que estimular la neurorreparación tal y como muestra el esquema, unido a una rápida recuperación funcional (Figura 5.1).

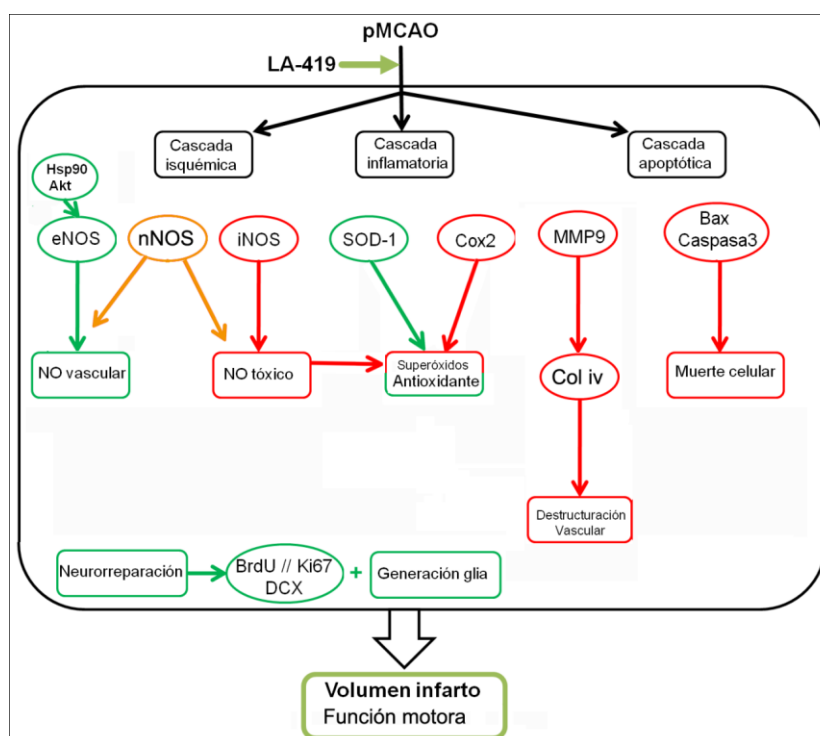


Figura 5.1. Resumen de los efectos del tratamiento con LA-419 pasados 15 minutos desde el infarto. En verde se representan los puntos en los que el compuesto actúa positivamente. En rojo se muestra donde LA-419 afecta disminuyendo la acción de los marcadores. Tras su administración, los resultados finales son una disminución en el volumen de infarto y una mejora de la coordinación motora.

Todos estos resultados sugieren que LA-419, además de ser un agente vasodilatador, trombolítico y antioxidante, es capaz de disminuir significativamente el volumen de infarto, provocado por la oclusión permanente de la Arteria Cerebral Media en el ratón, al administrarse intraperitonealmente de forma aguda post-infarto. Este fármaco es capaz de regular el sistema NOS, aumentando los niveles de eNOS y de sus activadores Akt y Hsp90, así como de nNOS, a la vez que disminuye los de iNOS. Su administración tras un ictus, es capaz de atenuar la expresión de distintos marcadores inflamatorios y apoptóticos en la zona de penumbra podría ser un fármaco potencialmente beneficioso en el tratamiento frente al ictus. Además parece potenciar una posterior neuroreparación.

5.2. ONO-1714

El Óxido Nítrico, generado a partir de L-Arginina por las NOS, media en muchas acciones fisiológicas del sistema nervioso, como son señalización neuronal y vasodilatación (Alderton et al., 2001; Guix et al., 2005). En condiciones patológicas, su alta acumulación tiene efectos dañinos que permiten neurotoxicidad en enfermedades neurodegenerativas y tras la isquemia (Guix et al., 2005; del et al., 2000). Se ha generado debate al comparar diversos estudios que consideran NO como una molécula dañina o protectora, dependiendo de la isoenzima y célula donde se genere (Huang et al., 1996; Iadecola, 1997). Las tres isoformas de la NOS regulan el daño cerebral producido tras un ictus. El NO generado por nNOS e iNOS promueve una devastación neuronal, particularmente, la descontrolada sobreexpresión de iNOS es responsable del aumento del daño cerebral (Swanson et al., 2004). Sin embargo, el NO producido por la isoforma eNOS en células endoteliales tiene un papel neuroprotector (Srivastava et al., 2012).

El diseño de fármacos reguladores de la actividad de las isoformas de NOS, debería tener en cuenta que NO es además un importante mediador en la fisiología del cerebro (Vincent, 2010; Steinert et al., 2010) y una excesiva regulación a la baja de su síntesis por inhibidores inespecíficos de la NOS (como pueden ser los análogos de L-Arginina), podría ser perjudicial. De hecho, la inhibición de eNOS empeora el daño en isquemias experimentales, mientras que el uso del inhibidor 7-nitroindazol (específico de nNOS) reduce significativamente el volumen de infarto (Kamii et al., 1996). Por otro lado, la inhibición de iNOS, se ha propuesto como una interesante estrategia

neuroprotectora en el tratamiento del ictus (Parmentier et al., 1999; Martinez-Murillo et al., 2007; Serrano et al., 2006). Hay estudios que coinciden con que la regulación específica de las isoformas de NOS supondría un incremento en la disponibilidad de NO a nivel vascular, al restaurar la actividad de eNOS durante la isquemia. Además, las investigaciones y los ensayos preclínicos con nuevos inhibidores específicos de nNOS e iNOS deberían ser promovidos.

5.2.1. OBJETIVO 6: Comprobar si ONO-1714 es capaz de inhibir los efectos de iNOS *in vitro* y si su administración afecta a la viabilidad celular.

ONO-1714 es un potente y selectivo inhibidor de iNOS, aunque también parece serlo de nNOS (Sekiguchi et al., 2004; Naka et al., 2000; Shibuta et al., 2003). Los resultados obtenidos *in vitro* muestran a ONO-1714 como un potente inhibidor de iNOS con excelente farmacocinética, lo que concuerda con estudios previos, por lo que podría ser un novedoso fármaco potencialmente eficaz como terapia en el accidente cerebrovascular (Naka et al., 2000; Shibuta et al., 2003).

5.2.2. OBJETIVO 7: Analizar si la administración crónica de ONO-1714 es capaz de reducir el volumen de infarto tras la pMCAO en el ratón.

Por otro lado, en los estudios *in vivo* mediante la oclusión permanente de la rama rostral de MCA que produce un pequeño infarto cortical, se observó que el grupo isquémico control mostraba infarto, mientras que en el grupo tratado con ONO-1714, el infarto era tan pequeño que no era detectable con la tinción de TTC. Esto sugiere que ONO-1714 es una molécula neuroprotectora en la isquemia cerebral.

Se sabe que la isquemia cerebral focal producida por pMCAO muestra cambios significantes en la expresión de iNOS (Hurtado et al., 2010). La administración crónica de ONO-1714, como inhibidor de iNOS, produce una mejora en los síntomas asociados con la isquemia focal, particularmente por reducción del volumen de infarto. Estos datos se apoyan en otros estudios previos que muestran inhibidores de iNOS como buenos candidatos para el tratamiento del ictus (Willmot et al., 2005a; Danielisova et al., 2011).

La expresión aguda de mediadores, como iNOS y MMP9, participa en el daño cerebral después de una isquemia (del Zoppo et al., 2000). La producción incontrolada de NO por iNOS en astrocitos, se ha visto que sobre regula MMP9, marcador que predice una mala evolución del infarto (Wang et al., 2011; Cuadrado et al., 2009;

Graham et al., 2012). También se ha comprobado que la inhibición de MMP9 protege el cerebro del daño isquémico (Graham et al., 2012; Svedin et al., 2007). Además, el mecanismo de acción de ONO-1714 podría regular a la baja los niveles de MMP9.

Por otro lado, se ha comprobado el efecto neuroprotector de ONO-1714 en la citotoxicidad inducida por la activación del receptor NMDA, a través de la inhibición de la isoforma nNOS (Kawanaka et al., 2003). Regulando de los niveles de NO a través de estos mecanismos por ONO-1714, se podría neuroproteger, aunque se requieren más estudios para confirmar esto.

6. CONCLUSIONES

1. La administración aguda de **LA-419** pasados 15 minutos desde la pMCAO disminuye significativamente **el volumen del infarto**.
2. El tratamiento, a los 15 minutos, con **LA-419** mejora significativamente la **coordinación motora**.
3. El **LA-419** aumenta la expresión génica de **eNOS** a las 6 horas del infarto. A su vez, aumenta los niveles **de Hsp90 y Akt** a las 24 horas, sugiriendo que su ruta de actuación se deba a la regulación de éstos y por ello, se obtenga una mayor producción de NO a nivel vascular.
4. Tras la administración de **LA-419** se mantienen disminuidos los niveles de expresión génica de las isoformas **nNOS** e **iNOS**. Las neuronas marcadas con nNOS mantienen su morfología, y el marcaje con iNOS continúa disminuido a las 24 horas.
5. El **LA-419** aumenta los niveles de antioxidantes como **SOD-1**, a la vez que disminuye la expresión de marcadores inflamatorios como **MMP9 y COX-2**.
6. El tratamiento con **LA-419** disminuye la expresión de marcadores proapoptóticos como **Bax y Caspasa 3**, lo que disminuiría el daño por apoptosis en la zona de penumbra.
7. El tratamiento con **LA-419** aumenta la respuesta de **astrocitos**, así como la de **oligodendrocitos** y **neuroblastos**, además de la densidad de marcadores de proliferación (**Ki67 y BrdU**), lo que podría inducir mecanismos de neurorreparación pasadas 48 horas.
8. La administración de **ONO-1714** es capaz de inhibir la liberación de NO por parte de iNOS *in vitro* sin afectar a la supervivencia celular.
9. El tratamiento crónico con **ONO-1714** antes y después de producir una oclusión permanente de la MCA es efectivo en la reducción del **volumen de infarto**.

7. RESUMEN

Las enfermedades cerebrovasculares son la primera causa de fallecimiento en las mujeres y la tercera en los hombres en España. A pesar de su trascendencia, actualmente sólo existe un compuesto farmacológico para su tratamiento, el r-tPA, pero la carencia de productos neuroprotectores eficaces determina que su búsqueda sea actualmente una de las prioridades de la industria farmacéutica. En este estudio se han ensayado dos fármacos dirigidos al control de la producción excesiva de Óxido Nítrico (NO), causante del estrés oxidativo, como posible mecanismo de protección contra los procesos neurodegenerativos inducidos por la isquemia y así limitar el déficit neurológico secundario. Por una parte, el compuesto LA-419 (LACER, SA), es capaz de aumentar la expresión génica de la isoforma endotelial de la NO-sintasa (eNOS) a las seis horas tras el infarto pudiendo estar mediado este proceso por reguladores como Hsp90 y Akt, produciendo un incremento de los niveles de NO a nivel vascular. Esta mayor liberación que determina vasodilatación, podría estar implicada en la disminución observada en el volumen del infarto, a la vez que en la mejoría del control motor secundario al ictus isquémico. Además, el producto LA-419 regula *in vivo* las cascadas inflamatorias y apoptóticas, a la vez que promueve la generación de nuevas células que podrían integrarse en los procesos de reparación del daño isquémico, contribuyendo por estas vías al efecto neurorreparador observado. El otro compuesto ensayado en este estudio, ONO-1714, es un conocido inhibidor del sistema NO sintasa, fundamentalmente a nivel de la isoforma inducible (iNOS). Mediante un novedoso procedimiento de síntesis de este compuesto, hemos obtenido un producto que actúa muy activamente frente a iNOS en ensayos *in vitro*. Su efectividad como tratamiento crónico en nuestro estudio ha ofrecido resultados positivos en la reducción del volumen del infarto. En conclusión, nuestros resultados demuestran que los compuestos LA-419 y ONO-1714 potencian los procesos de neurorreparación y neuroprotección, y apoyan su posible uso en la práctica clínica.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E, 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 41-53.

Ackah E, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurk C, Shibata R, Ouchi N, Easton RM, Galasso G, Birnbaum MJ, Walsh K, Sessa WC, 2005. Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J. Clin. Invest* 115: 2119-2127.

Adams PH, KJ, Biller J, Lovess Gordon D, Marsh R, 1993. TOAST investigator. Classification of subtypes of acute ischemia stroke. *Stroke* 24: 35-41.

Agulla J, Argibay B, Pérez-Mato M, Brea D, Ramos-Cabrer P, Castillo J, 2011. Comparación de la lesión producida en tres modelos animales de isquemia cerebral focal permanente mediante resonancia magnética. *REV NEUROL* 53: 265-274.

Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS, 1996. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke* 27: 1739-1743.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG, 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.

Aloisi F, 2001. Immune function of microglia. *Glia* 36: 165-179.

Alonso D, Serrano J, Rodriguez I, Ruiz-Cabello J, Fernandez AP, Encinas JM, Castro-Blanco S, Bentura ML, Santacana M, Richart A, Fernandez-Vizarra P, Uttenthal LO, Rodrigo J, 2002. Effects of oxygen and glucose deprivation on the expression and distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthases and on protein nitration in rat cerebral cortex. *J. Comp Neurol.* 443: 183-200.

Alvarez SJ, onso de LM, Gallego J, Gil-Peralta A, Casado I, Castillo J, Diez TE, Gil A, Jimenez C, Lago A, Martinez-Vila E, Ortega A, Rebollo M, Rubio F, 2006. [Plan for stroke healthcare delivery]. *Neurologia* 21: 717-726.

Álvarez-Sabin J, 2011. [Stroke secondary prevention: still a lot to do]. *Med. Clin. (Barc.)* 136: 340-342.

Appelros P, Stegmayr B, Terent A, 2009. Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review. *Stroke* 40: 1082-1090.

Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD, 1996. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 87: 1025-1035.

Áras-Lopez R, Xavier FE, Ferrer M, Balfagon G, 2009. Dexamethasone decreases neuronal nitric oxide release in mesenteric arteries from hypertensive rats through decreased protein kinase C activation. *Clin. Sci. (Lond)* 117: 305-312.

Arce, Arteaga, Sanchez-Mendoza, Oset-Gasque, Cañadas, Gonzalez, 2010. Added after Anoxia-Reoxygenation Stress, Genistein Rescues from Death the Rat Embryo Cortical Neurons. *Neuroscience & Medicine* 1: 50-59.

Arias-Carrion O, Olivares-Bunuelos T, Drucker-Colin R, 2007. [Neurogenesis in the adult brain]. *REV NEUROL* 44: 541-550.

- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O, 2002. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 8: 963-970.
- Ashish Dhir, S.K.Kulkarni, 2011. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide* 24: 125-131.
- Avendano C, Roda JM, Carceller F, ez-Tejedor E, 1995. Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain Res.* 673: 83-92.
- Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW, 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7: 111-118.
- Baron JC, 2001. Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach. Oxford University Press.
- Barone FC, Feuerstein GZ, 1999. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 19: 819-834.
- Bath PM, Willmot M, Leonardi-Bee J, Bath FJ, 2002. Nitric oxide donors (nitrates), L-arginine, or nitric oxide synthase inhibitors for acute stroke. *Cochrane. Database. Syst. Rev.*: CD000398.
- Beck H, Plate KH, 2009. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* 117: 481-496.
- Beckman JS, 1996. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 836-844.
- Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, van der WM, Smith C, Chen J, Harrison J, Martin JC, Tsai M, 1992. Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 438-445.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM, 1986a. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17: 1304-1308.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H, 1986b. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17: 472-476.
- Begley DJ, 2004. ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des* 10: 1295-1312.
- Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, Kanelakis KC, Noguchi S, Pratt WB, Osawa Y, 1999. Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J. Biol. Chem.* 274: 1472-1478.
- Bentsen L, Christensen L, Christensen A, Christensen H, 2014. Outcome and Risk Factors Presented in Old Patients Above 80 Years of Age Versus Younger Patients After Ischemic Stroke. *J. Stroke. Cerebrovasc. Dis.*
- Berlett BS, Friguet B, Yim MB, Chock PB, Stadtman ER, 1996. Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in Escherichia coli glutamine synthetase mimics adenylation: relevance to signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 1776-1780.
- Bogousslavsky J, Van MG, Regli F, 1988. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* 19: 1083-1092.

Bommel HM, Reif A, Frohlich LG, Frey A, Hofmann H, Marecak DM, Groehn V, Kotsonis P, La M, Koster S, Meinecke M, Bernhardt M, Weeger M, Ghisla S, Prestwich GD, Pfeleiderer W, Schmidt HH, 1998. Anti-pterins as tools to characterize the function of tetrahydrobiopterin in NO synthase. *J. Biol. Chem.* 273: 33142-33149.

Boxall AR, Garthwaite J, 1996. Long-term depression in rat cerebellum requires both NO synthase and NO-sensitive guanylyl cyclase. *Eur. J. Neurosci.* 8: 2209-2212.

Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH, 1991. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351: 714-718.

Bulut M, Selek S, Bez Y, Cemal KM, Gunes M, Karababa F, Celik H, Asuman SH, 2013. Lipid peroxidation markers in adult attention deficit hyperactivity disorder: New findings for oxidative stress. *Psychiatry Res.* 209: 638-642.

Busija DW, Bari F, Domoki F, Louis T, 2007. Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of N-methyl-D-aspartate in cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* 56: 89-100.

Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD, 1989. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 20: 904-910.

Calautti C, Baron JC, 2003. Functional neuroimaging studies of motor recovery after stroke in adults: a review. *Stroke* 34: 1553-1566.

Cameron HA, McKay R, 1998. Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 677-680.

Carmichael ST, 2005. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx.* 2: 396-409.

Carolei A, Prencipe M, Fiorelli M, Fieschi C, 1986. Severity of stroke and aspirin. *Neurology* 36: 1010-1011.

Castellanos M, Sobrino T, Millan M, Garcia M, Arenillas J, Nombela F, Brea D, Perez de la ON, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Davalos A, 2007. Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study. *Stroke* 38: 1855-1859.

Castellví E, 2007. Guía de información al paciente con ICTUS. València: Conselleria de Sanitat.

Castillo J, Dávalos A, Lema M, Serena J, Noya M, 1997. Glutamate is a marker for cerebral ischemia in cortical but not deep infarcts. *Cerebrovasc Dis* 7: 250.

Castillo J, Bogousslavsky J, 1997. Today classification of stroke. *Cerebrovasc Dis*: 5-11.

Castillo J, 1999. [Biochemistry of cerebral ischemia]. *Neurologia* 14 Suppl 4: 17-23.

Castillo J, 2000. [Physiopathology of cerebral ischemia]. *Rev. Neurol.* 30: 459-464.

Castillo J, Corredera E, Alvarez JM, Rodriguez JR, Noya M, 1995. [Cerebral ischemia and respiratory diseases]. *Rev. Neurol.* 23 Suppl 1: S61-S69.

Catala-Lopez F, Fernandez dL-B, Morant-Ginestar C, varez-Martin E, az-Guzman J, Genova-Maleras R, 2014. The national burden of cerebrovascular diseases in Spain: A population-based study using disability-adjusted life years. *Med. Clin. (Barc)*.

Celsi F, Pizzo P, Brini M, Leo S, Fotino C, Pinton P, Rizzuto R, 2009. Mitochondria, calcium and cell death: a deadly triad in neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 335-344.

Cesario V.Borlongan, Mitsuharu Yamamoto, Chutcharin Ungsuparkorn, Norie Takei, Michiko Kumazaki, Hideki Hida, Paul R.Sanberg, Hitoo Nishino, 2000b. Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *The FASEB Journal* 14: 1307-1317.

Cesario V.Borlongan, Mitsuharu Yamamoto, Chutcharin Ungsuparkorn, Norie Takei, Michiko Kumazaki, Hideki Hida, Paul R.Sanberg, Hitoo Nishino, 2000a. Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *The FASEB Journal* 14: 1307-1317.

Chan SL, Mattson MP, 1999. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res.* 58: 167-190.

Che X, Ye W, Panga L, Wu DC, Yang GY, 2001. Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res.* 902: 171-177.

Chen G, Goeddel DV, 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634-1635.

Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M, 2003a. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann. Neurol.* 53: 743-751.

Chen LY, Mehta JL, 1996. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27: 154-158.

Chen XH, Iwata A, Nonaka M, Browne KD, Smith DH, 2003b. Neurogenesis and glial proliferation persist for at least one year in the subventricular zone following brain trauma in rats. *J. Neurotrauma* 20: 623-631.

Cheng LL, Lean CL, Bogdanova A, Wright SC, Jr., Ackerman JL, Brady TJ, Garrido L, 1996. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magn Reson. Med.* 36: 653-658.

Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA, 2004. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx.* 1: 36-45.

Chi-Hua Chen, Matthew S.Panizzon, Lisa T.Eyler, Terry L.Jernigan, Ming T.Tsuang, William S.Kremen, Anders M.Dale, 2011. Genetic Influences on Cortical Regionalization in the Human Brain. *Neuron* 72: 537-544.

Choi DW, 1988. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 11: 465-469.

Chu M, Hu X, Lu S, Gan Y, Li P, Guo Y, Zhang J, Chen J, Gao Y, 2012. Focal cerebral ischemia activates neurovascular restorative dynamics in mouse brain. *Front Biosci. (Elite. Ed)* 4: 1926-1936.

- Church JE, Fulton D, 2006. Differences in eNOS activity because of subcellular localization are dictated by phosphorylation state rather than the local calcium environment. *J. Biol. Chem.* 281: 1477-1488.
- Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC, 2003. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation?. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 91-95.
- Clarkson AN, Huang BS, MacIsaac SE, Mody I, Carmichael ST, 2010. Reducing excessive GABAergic tonic inhibition promotes post-stroke functional recovery. *Nature* 468: 305-309.
- Claudio Napoli, Louis J. Ignarro, 2009. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Archives of Pharmacol Research* 32: 1103-1108.
- Claus HL, Walberer M, Simard ML, Emig B, Muesken SM, Rueger MA, Fink GR, Schroeter M, 2013. NG2 and NG2-positive cells delineate focal cerebral infarct demarcation in rats. *Neuropathology.* 33: 30-38.
- Colak G, Filiano AJ, Johnson GV, 2011. The application of permanent middle cerebral artery ligation in the mouse. *J. Vis. Exp.*
- Cory S, Huang DC, Adams JM, 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590-8607.
- Crossin KL, 1991. Nitric oxide (NO): a versatile second messenger in brain. *Trends Biochem. Sci.* 16: 81-82.
- Crowell RM, Olsson Y, Klatzo I, Ommaya A, 1970. Temporary occlusion of the middle cerebral artery in the monkey: clinical and pathological observations. *Stroke* 1: 439-448.
- Cuadrado E, Rosell A, Penalba A, Slevin M, varez-Sabin J, Ortega-Aznar A, Montaner J, 2009. Vascular MMP-9/TIMP-2 and neuronal MMP-10 up-regulation in human brain after stroke: a combined laser microdissection and protein array study. *J. Proteome. Res.* 8: 3191-3197.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ, 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219.
- Danielisova V, Burda J, Nemethova M, Gottlieb M, 2011. Aminoguanidine administration ameliorates hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion in rat. *Neurochem. Res.* 36: 476-486.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB, 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8: 752-758.
- Davies PF, 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 75: 519-560.
- Dawson VL, Dawson TM, 1996a. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death. Differ.* 3: 71-78.
- Dawson VL, Dawson TM, 1996b. Nitric oxide neurotoxicity. *J. Chem. Neuroanat.* 10: 179-190.
- Del Zoppo ZG, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ, 2000. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* 10: 95-112.

Dennis D.M.O'Leary, Shen-Ju Chou, Setsuko Sahara, 2007. Area Patterning of the Mammalian Cortex. *Neuron* 56: 252-269.

Di NM, Papa F, 2003. Association between blood pressure and C-reactive protein levels in acute ischemic stroke. *Hypertension* 42: 1117-1123.

Díez-Tejedor E, del BO, Alvarez SJ, Munoz M, Abiusi G, 2001. [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. *Rev. Neurol.* 33: 455-464.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM, 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605.

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM, 1997. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.* 185: 601-607.

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ, 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141: 2407-2412.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA, 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22: 391-397.

Dong QP, He JQ, Chai Z, 2013. Astrocytic Ca(2+) waves mediate activation of extrasynaptic NMDA receptors in hippocampal neurons to aggravate brain damage during ischemia. *Neurobiol. Dis* 58: 68-75.

Dong Y, Benveniste EN, 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36: 180-190.

Downward J, 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 262-267.

Duncan PW, Goldstein LB, Matchar D, Divine GW, Feussner J, 1992. Measurement of motor recovery after stroke. Outcome assessment and sample size requirements. *Stroke* 23: 1084-1089.

Duran WN, Dillon PK, 1990. Acute microcirculatory effects of platelet-activating factor. *J. Lipid Mediat.* 2 Suppl: S215-S227.

Dusting GJ, 1995. Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J. Vasc. Res.* 32: 143-161.

Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y, 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57: 1835-1840.

Eliasson MJ, Huang Z, Ferrante RJ, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, Moskowitz MA, 1999. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J. Neurosci.* 19: 5910-5918.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S, 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.

- Fan W, Dai Y, Xu H, Zhu X, Cai P, Wang L, Sun C, Hu C, Zheng P, Zhao BQ, 2014. Caspase-3 modulates regenerative response after stroke. *Stem. Cells.* 32: 473-486.
- Farooq MU, Gorelick PB, 2013. Vascular cognitive impairment. *Curr. Atheroscler. Rep.* 15: 330.
- Fern R, Waxman SG, Ransom BR, 1994. Modulation of anoxic injury in CNS white matter by adenosine and interaction between adenosine and GABA. *J. Neurophysiol.* 72: 2609-2616.
- Fernandez AP, Pozo-Rodrigalvarez A, Serrano J, Martinez-Murillo R, 2010. Nitric oxide: target for therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des* 16: 2837-2850.
- Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T, 1998. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J. Biol. Chem.* 273: 3125-3128.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC, 1997. Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 825: 179-193.
- Fisher M, 2004. The ischemic penumbra: identification, evolution and treatment concepts. *Cerebrovasc Dis* 17 Suppl 1: 1-6.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R, 2001. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ. Res.* 88: E68-E75.
- Forster C, Clark HB, Ross ME, Iadecola C, 1999. Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. *Acta Neuropathol.* 97: 215-220.
- Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H, 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23: 1121-1131.
- Forstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F, 1990. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 727-732.
- Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F, 1991. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1849-1857.
- Fuentes B, Gallego J, Gil-Nunez A, Morales A, Purroy F, Roquer J, Segura T, Tejada J, Lago A, ez-Tejedor E, onso de LM, varez-Sabin J, Arenillas J, Calleja S, Casado I, Castellanos M, Castillo J, Davalos A, az-Otero F, Egido JA, Lopez-Fernandez JC, Freijo M, Garcia PA, Gilo F, Irimia P, Maestre J, Masjuan J, Marti-Fabregas J, Martinez-Sanchez P, Martinez-Vila E, Molina C, Nombela F, Ribo M, Rodriguez-Yanez M, Rubio F, Serena J, Simal P, Vivancos J, 2012. Guidelines for the preventive treatment of ischaemic stroke and TIA (I). Update on risk factors and life style. *Neurologia* 27: 560-574.
- Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH, 1999. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 842: 92-100.
- Fulton D, Church JE, Ruan L, Li C, Sood SG, Kemp BE, Jennings IG, Venema RC, 2005. Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83. *J. Biol. Chem.* 280: 35943-35952.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC, 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601.

Furchgott RF, 1990. The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand.* 139: 257-270.

Furchgott RF, Carvalho MH, Khan MT, Matsunaga K, 1987. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels* 24: 145-149.

Furchgott RF, Zawadzki JV, 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.

Furie K L, Wilterdink J L, Kistler J P, 2002. Risk factor management and medical therapy of carotid artery stenosis. *journal* 10.

Gallego J, Herrera M, Jerico I, Munoz R, Aymerich N, Martinez-Vila E, 2008. [Stroke in the XXI century. Emergency care]. *An. Sist. Sanit. Navar.* 31 Suppl 1: 15-29.

García-Bonilla L, Rosell A, Torregrosa G, Salom JB, Alborch E, Gutiérrez M, Díez-Tejedor E, Martínez-Murillo R, Agulla J, Ramos-Cabrera P, Castillo J, Gasull T, Montaner J, 2011. Guía de recomendaciones en la aplicación de modelos animales para el estudio del ictus. *Neurología* 26: 105-110.

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC, 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821-824.

Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, varez-Buylla A, 1998. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J. Neurobiol.* 36: 234-248.

Garden GA, Moller T, 2006. Microglia biology in health and disease. *J. Neuroimmune. Pharmacol.* 1: 127-137.

Gesuite R, Orsini F, Zanier ER, Albani D, Deli MA, Bazzoni G, De Simoni MG, 2011. Glial cells drive preconditioning-induced blood-brain barrier protection. *Stroke* 42: 1445-1453.

Ghosh DK, bu-Soud HM, Stuehr DJ, 1995. Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase. *Biochemistry* 34: 11316-11320.

Gibson CL, Coughlan TC, Murphy SP, 2005. Glial nitric oxide and ischemia. *Glia* 50: 417-426.

Gil-Nunez AC, Villanueva JA, 2001. Advantages of lipid-lowering therapy in cerebral ischemia: role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1: 85-95.

Ginsberg MD, 1997. Injury mechanisms in the ischaemic penumbra. Approaches to neuroprotection in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 7: 7-12.

Ginsberg MD, Pulsinelli WA, 1994. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann. Neurol.* 36: 553-554.

Giralt-Steinhauer E, Jimenez-Conde J, Soriano TC, Mola M, Rodriguez-Campello A, Cuadrado-Godia E, Ois A, Fernandez-Cadenas I, Carrera C, Montaner J, az Navarro RM, Vives-Bauza C,

Roquer J, 2013. Exploring the genetic basis of stroke. Spanish stroke genetics consortium. *Neurologia*.

Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD, 1988. Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* 51: 1455-1464.

Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, DeGraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL, 2006. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke* 37: 1583-1633.

Gomez C., 1993. Time is brain. *J. Stroke. Cerebrovasc. Dis.:* 1-2.

Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA, 2008. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456: 745-749.

Gorelick PB, Sacco RL, Smith DB, Alberts M, Mustone-Alexander L, Rader D, Ross JL, Raps E, Ozer MN, Brass LM, Malone ME, Goldberg S, Booss J, Hanley DF, Toole JF, Greengold NL, Rhew DC, 1999. Prevention of a first stroke: a review of guidelines and a multidisciplinary consensus statement from the National Stroke Association. *JAMA* 281: 1112-1120.

Gorren AC, List BM, Schrammel A, Pitters E, Hemmens B, Werner ER, Schmidt K, Mayer B, 1996. Tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric oxide synthase: evidence for two identical highly anticooperative pteridine binding sites. *Biochemistry* 35: 16735-16745.

Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H, 1996. Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.* 385: 63-66.

Graham CA, Chan RW, Chan DY, Chan CP, Wong LK, Rainer TH, 2012. Matrix metalloproteinase 9 mRNA: an early prognostic marker for patients with acute stroke. *Clin. Biochem.* 45: 352-355.

Grenert JP, Sullivan WP, Fadden P, Haystead TA, Clark J, Mimnaugh E, Kruttsch H, Ochel HJ, Schulte TW, Sausville E, Neckers LM, Toft DO, 1997. The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J. Biol. Chem.* 272: 23843-23850.

Gribkoff VK, Winkler RJ, 2005. Voltage-gated cation channel modulators for the treatment of stroke. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 14: 579-592.

Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P, 1996. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF-kappaB activation. *Science* 274: 1383-1385.

Gross SS, Wolin MS, 1995. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol* 57: 737-769.

Grotta JC, Lemak NA, Gary H, Fields WS, Vital D, 1985. Does platelet antiaggregant therapy lessen the severity of stroke?. *Neurology* 35: 632-636.

Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. 1992. Manejo del paciente con enfermedad vascular cerebral aguda.

Guadagno JV, Donnan GA, Markus R, Gillard JH, Baron JC, 2004. Imaging the ischaemic penumbra. *Curr. Opin. Neurol.* 17: 61-67.

Guix FX, Uribealago I, Coma M, Munoz FJ, 2005. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* 76: 126-152.

Gusev E, Skvortsova V, 2003. *Brain Ischemia*.1.

Hagmann WK, Caldwell CG, Chen P, Durette PL, Esser CK, Lanza TJ, Kopka IE, Guthikonda R, Shah SK, Maccoss M, Chabin RM, Fletcher D, Grant SK, Green BG, Humes JL, Kelly TM, Luell S, Meurer R, Moore V, Pacholok SG, Pavia T, Williams HR, Wong KK, 2000. Substituted 2-aminopyridines as inhibitors of nitric oxide synthases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 1975-1978.

Hakim AM, 1987. The cerebral ischemic penumbra. *Can. J. Neurol. Sci.* 14: 557-559.

Hallenbeck JM, 1996. Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv. Neurol.* 71: 281-297.

Hamilton NB, Attwell D, Hall CN, 2010. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics.* 2.

Hatashita S, Hoff JT, 1990. Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. *Stroke* 21: 582-588.

Heiss ATD, Kracht LW, TA, Ground M, Pawlik G, 2001. Penumbra probability thresholds of cortical flumazenil binding and blood flow predicting tissue outcome in patients with cerebral ischemia. *Brain* 124: 20-29.

Heiss WD, Graf R, 1994. The ischemic penumbra. *Curr. Opin. Neurol.* 7: 11-19.

Hernandez MR, Tonda R, Arderiu G, Pino M, Serradell M, Escolar G, 2005. Antithrombotic effect of a new nitric oxide donor (LA419) on experimental thrombogenesis. *Eur. J. Clin. Invest* 35: 337-342.

Herrmann O, Tarabin V, Suzuki S, Attigah N, Coserea I, Schneider A, Vogel J, Prinz S, Schwab S, Monyer H, Brombacher F, Schwaninger M, 2003. Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23: 406-415.

Hesselbarth D, Franke C, Hata R, Brinker G, Hoehn-Berlage M, 1998. High resolution MRI and MRS: a feasibility study for the investigation of focal cerebral ischemia in mice. *NMR Biomed.* 11: 423-429.

Hevel JM, White KA, Marletta MA, 1991. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 266: 22789-22791.

Hirst WD, Young KA, Newton R, Allport VC, Marriott DR, Wilkin GP, 1999. Expression of COX-2 by normal and reactive astrocytes in the adult rat central nervous system. *Mol. Cell Neurosci.* 13: 57-68.

- Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S, 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 191-220.
- Hossmann KA, 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann. Neurol.* 36: 557-565.
- Hossmann KA, 2006. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol. Neurobiol.* 26: 1057-1083.
- Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA, 1996. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 16: 981-987.
- Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA, 1994. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265: 1883-1885.
- Hurtado O, Pradillo JM,onso-Escolano D, Lorenzo P, Sobrino T, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA, 2006. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc Dis* 21 Suppl 2: 54-63.
- Hurtado O, Serrano J, Sobrado M, Fernandez AP, Lizasoain I, Martinez-Murillo R, Moro MA, Martinez A, 2010. Lack of adrenomedullin, but not complement factor H, results in larger infarct size and more extensive brain damage in a focal ischemia model. *Neuroscience* 171: 885-892.
- Iadecola C, 1997. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 20: 132-139.
- Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME, 1997. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Neurosci.* 17: 9157-9164.
- Ido Y, Chang K, Woolsey TA, Williamson JR, 2001. NADH: sensor of blood flow need in brain, muscle, and other tissues. *FASEB J.* 15: 1419-1421.
- Ignarro LJ, 1990. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16: 477-483.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G, 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84: 9265-9269.
- Ignarro LJ, Gold ME, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G, Frank G, 1989. Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ. Res.* 64: 315-329.
- Ijichi A, Sakuma S, Tofilon PJ, 1995. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in normal rat astrocyte cultures. *Glia* 14: 87-93.
- Instituto Nacional de Estadística, 2002. Causas de Mortalidad en 1999. Instituto Nacional Estadística.
- Instituto Nacional de Estadística, 2009. Defunciones según la causa de muerte. Instituto Nacional de Estadística.

- Irikura K, Maynard KI, Lee WS, Moskowitz MA, 1994. L-NNA decreases cortical hyperemia and brain cGMP levels following CO₂ inhalation in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Physiol* 267: H837-H843.
- Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS, 1992. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 431-437.
- Jarvinen MK, Wollmann WJ, Powrozek TA, Schultz JA, Powley TL, 1999. Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. *Anat. Embryol. (Berl)* 199: 99-112.
- Jian MY, Koizumi T, Kubo K, 2005. Effects of nitric oxide synthase inhibitor on acid aspiration-induced lung injury in rats. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 18: 33-39.
- Jie Pan, Angelos-Aristeidis Konostas, Brian Bateman, Girolamo A.Ortolano, John Pile-Spellman, 2007. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 49: 93-102.
- Jin K, Minami M, Xie L, Sun Y, Mao XO, Wang Y, Simon RP, Greenberg DA, 2004. Ischemia-induced neurogenesis is preserved but reduced in the aged rodent brain. *Aging Cell* 3: 373-377.
- Kamii H, Mikawa S, Murakami K, Kinouchi H, Yoshimoto T, Reola L, Carlson E, Epstein CJ, Chan PH, 1996. Effects of nitric oxide synthase inhibition on brain infarction in SOD-1-transgenic mice following transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 16: 1153-1157.
- Kaur C, Ling EA, 2008. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr. Neurovasc. Res.* 5: 71-81.
- Kawanaka Y, Kobayashi K, Kusuda S, Tatsumi T, Murota M, Nishiyama T, Hisaichi K, Fujii A, Hirai K, Naka M, Komeno M, Odagaki Y, Nakai H, Toda M, 2003. Design and synthesis of orally bioavailable inhibitors of inducible nitric oxide synthase. Identification of 2-azabicyclo[4.1.0]heptan-3-imines. *Bioorg. Med. Chem.* 11: 1723-1743.
- Kelly RA, Balligand JL, Smith TW, 1996. Nitric oxide and cardiac function. *Circ. Res.* 79: 363-380.
- Knot HJ, Zimmermann PA, Nelson MT, 1996. Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. *J. Physiol* 492 (Pt 2): 419-430.
- Kokaia Z, Lindvall O, 2003a. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 127-132.
- Kokaia Z, Lindvall O, 2003b. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 127-132.
- Kono Y, 1978. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 186: 189-195.
- Kristensen B, Malm J, Carlberg B, Stegmayr B, Backman C, Fagerlund M, Olsson T, 1997. Epidemiology and etiology of ischemic stroke in young adults aged 18 to 44 years in northern Sweden. *Stroke* 28: 1702-1709.

- Kroemer G, 1997. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* 3: 614-620.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN, 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88: 4651-4655.
- Kurzepa J, Kurzepa J, Golab P, Czerska S, Bielewicz J, 2014. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke. *Int. J. Neurosci.*
- Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T, 1998. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 139: 1338-1345.
- LÁCER SA, 2005. Derivates of isosorbide mononitrate as vasodilator agents with reduced tolerance. WO Patent 0020420.
- Lamas S, Perez-Sala D, Moncada S, 1998. Nitric oxide: from discovery to the clinic. *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 436-438.
- Lees GJ, 1993. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J. Neurol. Sci.* 114: 119-122.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P, 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185: 1481-1486.
- Li H, Forstermann U, 2000. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.* 190: 244-254.
- Li J, Yuan J, 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27: 6194-6206.
- Li WL, Yu SP, Ogle ME, Ding XS, Wei L, 2008. Enhanced neurogenesis and cell migration following focal ischemia and peripheral stimulation in mice. *Dev. Neurobiol.* 68: 1474-1486.
- Lin B, 2013. Encephalopathy: a vicious cascade following forebrain ischemia and hypoxia. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 13: 57-70.
- Lind P, Engstrom G, Stavenow L, Janzon L, Lindgarde F, Hedblad B, 2004. Risk of myocardial infarction and stroke in smokers is related to plasma levels of inflammation-sensitive proteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 577-582.
- Lindvall O, Kokaia Z, 2010. Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation?. *J. Clin. Invest* 120: 29-40.
- Lippoldt A, Reichel A, Moenning U, 2005. Progress in the identification of stroke-related genes: emerging new possibilities to develop concepts in stroke therapy. *CNS. Drugs* 19: 821-832.
- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ, 1994. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke* 25: 1481-1488.
- Llorente R, Villa P, Marco EM, Viveros MP, 2012. Analyzing the effects of a single episode of neonatal maternal deprivation on metabolite profiles in rat brain: a proton nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Neuroscience* 201: 12-19.

Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, de SG, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Roger VL, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J, 2010. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121: e46-e215.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R, 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84-91.

Love S, 1999. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 9: 119-131.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH, 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* 120: 227-237.

Lowenstein CJ, Snyder SH, 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705-707.

Lu G, Wai SM, Poon WS, Yew DT, 2005. Ki67 and doublecortin positive cells in the human prefrontal cortices of normal aging and vascular dementia. *Microsc. Res. Tech.* 68: 255-257.

Lucas DR, Newhouse JP, 1957. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA. Arch. Ophthalmol.* 58: 193-201.

Markus HS, Khan U, Birns J, Evans A, Kalra L, Rudd AG, Wolfe CD, Jerrard-Dunne P, 2007. Differences in stroke subtypes between black and white patients with stroke: the South London Ethnicity and Stroke Study. *Circulation* 116: 2157-2164.

Martínez-Murillo R, Fernández AP, Serrano J, Rodrigo J, Salas E, Mourelle M, Martínez A, 2007. The nitric oxide donor LA 419 decreases brain damage in a focal ischemia model. *Neurosci. Lett.* 415: 149-153.

Martínez-Rodríguez R, Martínez-Murillo R, 1984. In vitro d-amphetamine action on oxidoreductase activity of several rat nervous centres. *Acta Histochem.* 74: 85-90.

Martínez-Vila E, Irimia P, 2000. Factores de riesgo del ictus/ Risk factors of the stroke. *ANALES Sis San Navarra* 23: 25-31.

Martinou JC, Green DR, 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 63-67.

Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, Pruitt SC, 2004. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J. Neurosci.* 24: 1726-1733.

Matías-Guía J, 2009. Estrategia en ictus del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Consumo.

Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Chuai M, Imai Y, Takahashi H, Tanaka J, 2008. Accumulation of macrophage-like cells expressing NG2 proteoglycan and Iba1 in ischemic core of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 28: 149-163.

Mayer B, Werner ER, 1995. In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 351: 453-463.

- McMillan K, Masters BS, 1995. Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry* 34: 3686-3693.
- Megson IL, Leslie SJ, 2009. LA-419, a nitric-oxide donor for the treatment of cardiovascular disorders. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10: 276-285.
- Meldrum B, Evans M, Griffiths T, Simon R, 1985. Ischaemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. *Br. J. Anaesth.* 57: 44-46.
- Merino JJ, Cordero MI, Sandi C, 2000. Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3283-3290.
- Merino JJ, Largo C, Caz V, Ibarra L, Posadas S, de ME, 2011. Growth hormone increases neural cell adhesion polysialylation state in the dentate gyrus of gamma-irradiated rats. *Synapse* 65: 1239-1243.
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T, 1997. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272: 15583-15586.
- Michel T, 1999. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 1361-1366.
- Miettinen S, Fusco FR, Yrjanheikki J, Keinänen R, Hirvonen T, Roivainen R, Narhi M, Hokfelt T, Koistinaho J, 1997. Spreading depression and focal brain ischemia induce cyclooxygenase-2 in cortical neurons through N-methyl-D-aspartic acid-receptors and phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 6500-6505.
- Miller MR, Megson IL, 2007. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br. J. Pharmacol.* 151: 305-321.
- Miquel J, Blasco M, 1978. A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp. Gerontol.* 13: 389-396.
- Moncada S, Higgs A, Furchgott R, 1997. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.* 49: 137-142.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA, 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA, 1989. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1709-1715.
- Montaner J, varez-Sabin J, Barbera G, Angles A, Molina C, Abilleira S, Arenillas J, Chacon P, Monasterio J, 2001. [Correlation between the expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the acute phase of an ischemic stroke]. *Rev. Neurol.* 33: 115-118.
- Moreno VP, Garcia-Raso A, Garcia-Bueno MJ, Sanchez-Sanchez C, Meseguer E, Mata R, Llamas P, 2008. [Vascular risk factors in patients with ischaemic stroke. Distribution according to age, sex and stroke subtype]. *Rev. Neurol.* 46: 593-598.

Morikawa E, Ginsberg MD, Dietrich WD, Duncan RC, Kraydieh S, Globus MY, Busto R, 1992. The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia: histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 12: 380-389.

Moro MA, De AJ, Leza JC, Lorenzo P, Fernandez AP, Bentura ML, Bosca L, Rodrigo J, Lizasoain I, 1998. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. *Eur. J. Neurosci.* 10: 445-456.

Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C, 2010. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67: 181-198.

Muneton-Gomez VC, Doncel-Perez E, Fernandez AP, Serrano J, Pozo-Rodríguez A, Vellosillo-Huerta L, Taylor JS, Cardona-Gomez GP, Nieto-Sampedro M, Martínez-Murillo R, 2012. Neural differentiation of transplanted neural stem cells in a rat model of striatal lacunar infarction: light and electron microscopic observations. *Front Cell Neurosci.* 6: 30.

Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K, 1990. Selective sparing of Betz cells in primary motor area in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Neuropathol.* 80: 560-562.

Myers PR, Minor RL, Jr., Guerra R, Jr., Bates JN, Harrison DG, 1990. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345: 161-163.

Naito Y, Takagi T, Ichikawa H, Tomatsuri N, Kuroda M, Isozaki Y, Katada K, Uchiyama K, Kokura S, Yoshida N, Okanoue T, Yoshikawa T, 2004. A novel potent inhibitor of inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, reduces intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Nitric. Oxide.* 10: 170-177.

Naka M, Nanbu T, Kobayashi K, Kamanaka Y, Komeno M, Yanase R, Fukutomi T, Fujimura S, Seo HG, Fujiwara N, Ohuchida S, Suzuki K, Kondo K, Taniguchi N, 2000. A potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ONO-1714, a cyclic amidine derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270: 663-667.

Narbeh Melikian, Michael D.Seddon, Barbara Casadei, Philip J.Chowienczyk, Ajay M.Shah, 2009. Neuronal Nitric Oxide Synthase and Human Vascular Regulation. *Trends in Cardiovascular Medicine* 19: 256-262.

Nason DM, Heck SD, Bodenstein MS, Lowe JA, III, Nelson RB, Liston DR, Nolan CE, Lanyon LF, Ward KM, Volkmann RA, 2004. Substituted 6-phenyl-pyridin-2-ylamines: selective and potent inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 4511-4514.

National Institute of Neurological Disorders and Stroke, 1990. Classification of cerebrovascular disease III. *Stroke* 21: 741.

Neumann-Haefelin C, Brinker G, Uhlenkuken U, Pillekamp F, Hossmann KA, Hoehn M, 2002. Prediction of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy of clot embolism: an MRI investigation in rat brain. *Stroke* 33: 1392-1398.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F, 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308: 1314-1318.

Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X, 2009. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 9-22.

- Nordborg C, Sokrab TE, Johansson BB, 1994. Oedema-related tissue damage after temporary and permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20: 56-65.
- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC, 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.* 451: 205-212.
- O'Neill BT, Abel ED, 2005. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe?. *J. Clin. Invest* 115: 2059-2064.
- Ogasawara H, Koizumi T, Yamamoto H, Kubo K, 2003. Effects of a selective nitric oxide synthase inhibitor on endotoxin-induced alteration in hypoxic pulmonary vasoconstriction in sheep. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42: 521-526.
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST, 2006. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J. Neurosci.* 26: 13007-13016.
- Organización Mundial de la Salud, 2003. The Atlas of disease cardiovascular and stroke.. OMS.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S, 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S, 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Parmentier S, Bohme GA, Lerouet D, Damour D, Stutzmann JM, Margaill I, Plotkine M, 1999. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br. J. Pharmacol.* 127: 546-552.
- Parsons MP, Raymond LA, 2014. Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. *Neuron* 82: 279-293.
- Paulis L, Simko F, 2007. LA419, a novel nitric oxide donor, prevents cardiac remodeling via the endothelial nitric oxide synthase pathway: NO donors as a means of antiremodeling. *Hypertension* 50: 1009-1011.
- Paulson OB, Newman EA, 1987. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow?. *Science* 237: 896-898.
- Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L, 1990. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 2: 161-192.
- Pekny M, Nilsson M, 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427-434.
- Pena E, Padro T, Molins B, Vilahur G, Badimon L, 2011. Proteomic signature of thrombin-activated platelets after in vivo nitric oxide-donor treatment: coordinated inhibition of signaling (phosphatidylinositol 3-kinase-gamma, 14-3-3zeta, and growth factor receptor-bound protein 2) and cytoskeleton protein translocation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 2560-2569.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D, 2006. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443: 700-704.
- Perry VH, 1998. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *J. Neuroimmunol.* 90: 113-121.

Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F, 1991. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88: 10480-10484.

Porras M, Martin MT, Teran E, Mourelle M, Vergara P, 2008. The nitric oxide donor LA-419 [S-(6-Nitro-oxi-hexahydro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)thioacetate] prevents intestinal dysmotility, bacterial translocation, and inflammation in a rat model of enteritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324: 740-748.

Porter JT, McCarthy KD, 1996. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J. Neurosci.* 16: 5073-5081.

Pozo-Rodrigalvarez A, Gradillas A, Serrano J, Fernandez AP, Martinez-Murillo R, Perez-Castells J, 2012. New synthesis and promising neuroprotective role in experimental ischemic stroke of ONO-1714. *Eur. J. Med. Chem.* 54: 439-446.

Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE, Michel T, 1998. Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 273: 27383-27388.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Skvortsov VG, Mandrugina AA, Fedoseev VM, 2005. Structure and activity of NO synthase inhibitors specific to the L-arginine binding site. *Biochemistry (Mosc.)* 70: 8-23.

Provost C, Choufani F, Avedanian L, Bkaily G, Gobeil F, Jacques D, 2010. Nitric oxide and reactive oxygen species in the nucleus revisited. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 88: 296-304.

Pryor WA, Squadrito GL, 1995. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol* 268: L699-L722.

Pulsinelli W, 1992. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 339: 533-536.

Pulsinelli WA, 1985. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog. Brain Res.* 63: 29-37.

Puro DG, 2007. Physiology and pathobiology of the pericyte-containing retinal microvasculature: new developments. *Microcirculation.* 14: 1-10.

Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, varez-Buylla A, 2006. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp Neurol* 494: 415-434.

Ransom BR, Philbin DM, Jr., 1992. Anoxia-induced extracellular ionic changes in CNS white matter: the role of glial cells. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 70 Suppl: S181-S189.

Ransom BR, Sontheimer H, 1992. The neurophysiology of glial cells. *J. Clin. Neurophysiol.* 9: 224-251.

Rashid P, Weaver C, Leonardi-Bee J, Bath F, Fletcher S, Bath P, 2003. The effects of transdermal glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor, on blood pressure, cerebral and cardiac hemodynamics, and plasma nitric oxide levels in acute stroke. *J. Stroke Cerebrovasc Dis* 12: 143-151.

Reif A, Frohlich LG, Kotsonis P, Frey A, Bommel HM, Wink DA, Pfeleiderer W, Schmidt HH, 1999. Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase. *J. Biol. Chem.* 274: 24921-24929.

Renault-Mihara F, Okada S, Shibata S, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, 2008. Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 1649-1653.

Richards MK, Marletta MA, 1994. Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. *Biochemistry* 33: 14723-14732.

Rodrigo J, Alonso D, Fernandez A, Serrano J, Lopez J, 2000. [Nitric oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity]. *An. Sist. Sanit. Navar.* 23: 195-235.

Rodrigo J, Fernandez AP, Alonso D, Serrano J, Fernandez-Vizarra P, Martinez-Murillo R, Bentura ML, Martinez A, 2004. Nitric oxide in the rat cerebellum after hypoxia/ischemia. *Cerebellum*. 3: 194-203.

Rodrigo J, Fernandez AP, Serrano J, Peinado MA, Martinez A, 2005. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* 39: 26-50.

Rodrigo J, Riveros-Moreno V, Bentura ML, Uttenthal LO, Higgs EA, Fernandez AP, Polak JM, Moncada S, Martinez-Murillo R, 1997. Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. *J. Comp Neurol.* 378: 522-534.

Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, badia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martinez-Murillo R, Polak JM, Moncada S, 1994. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 345: 175-221.

Rodriguez-Gonzalez R, Agulla J, Perez-Mato M, Sobrino T, Castillo J, 2011b. Neuroprotective effect of neuroserpin in rat primary cortical cultures after oxygen and glucose deprivation and tPA. *Neurochem. Int.* 58: 337-343.

Rodriguez-Gonzalez R, Agulla J, Perez-Mato M, Sobrino T, Castillo J, 2011a. Neuroprotective effect of neuroserpin in rat primary cortical cultures after oxygen and glucose deprivation and tPA. *Neurochem. Int.* 58: 337-343.

Roquer J, Campello AR, Gomis M, 2003. Sex differences in first-ever acute stroke. *Stroke* 34: 1581-1585.

Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernandez-Guillamon M, Lo EH, Montaner J, 2008. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 39: 1121-1126.

Rosell A, Moranco A, Navarro-Sobrino M, Martinez-Saez E, Hernandez-Guillamon M, Lope-Piedrafita S, Barcelo V, Borrás F, Penalba A, Garcia-Bonilla L, Montaner J, 2013. Factors secreted by endothelial progenitor cells enhance neurorepair responses after cerebral ischemia in mice. *PLoS. One.* 8: e73244.

Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, 1998. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29: 2189-2195.

Rossi DJ, Brady JD, Mohr C, 2007. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat. Neurosci.* 10: 1377-1386.

Rossig L, Haendeler J, Hermann C, Malchow P, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S, 2000. Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 25502-25507.

Rothwell NJ, Busbridge NJ, Lefeuve RA, Hardwick AJ, Gauldie J, Hopkins SJ, 1991. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 69: 1465-1469.

Roviezzo F, Cuzzocrea S, Di LA, Brancalone V, Mazzon E, Di PR, Bucci M, Cirino G, 2007. Protective role of PI3-kinase-Akt-eNOS signalling pathway in intestinal injury associated with splanchnic artery occlusion shock. *Br. J. Pharmacol.* 151: 377-383.

Ruiz-Hurtado G, Fernandez-Velasco M, Mourelle M, Delgado C, 2007. LA419, a novel nitric oxide donor, prevents pathological cardiac remodeling in pressure-overloaded rats via endothelial nitric oxide synthase pathway regulation. *Hypertension* 50: 1049-1056.

Sacco RL, Benjamin EJ, Broderick JP, Dyken M, Easton JD, Feinberg WM, Goldstein LB, Gorelick PB, Howard G, Kittner SJ, Manolio TA, Whisnant JP, Wolf PA, 1997. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors. *Stroke* 28: 1507-1517.

Sacco RL, Chong JY, Prabhakaran S, Elkind MS, 2007. Experimental treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet* 369: 331-341.

Sacco RL, Elkind M, Boden-Albala B, Lin IF, Kargman DE, Hauser WA, Shea S, Paik MC, 1999. The protective effect of moderate alcohol consumption on ischemic stroke. *JAMA* 281: 53-60.

Sakahira H, Enari M, Nagata S, 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99.

Salas E, Badimon L, 2006. Líneas de investigación en el uso terapéutico del óxido nítrico.. *Rev Esp Cardiol* 6: 51A-58A.

Salerno L, Sorrenti V, Di GC, Romeo G, Siracusa MA, 2002. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr. Pharm. Des* 8: 177-200.

Salom JB, Orti M, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E, 2000. Reduction of infarct size by the NO donors sodium nitroprusside and spermine/NO after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 865: 149-156.

Salter M, Knowles RG, Moncada S, 1991. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 291: 145-149.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM, 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.

Saver JL, 2006. Time is brain--quantified. *Stroke.* 37: 263-266.

Scheid MP, Woodgett JR, 2001. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 760-768.

- Schild L, Huppelsberg J, Kahlert S, Keilhoff G, Reiser G, 2003. Brain mitochondria are primed by moderate Ca^{2+} rise upon hypoxia/reoxygenation for functional breakdown and morphological disintegration. *J. Biol. Chem.* 278: 25454-25460.
- Schinkel AH, 1999. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36: 179-194.
- Schmidt HH, Murad F, 1991. Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181: 1372-1377.
- Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F, Bohme E, 1988. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 154: 213-216.
- Schneider GH, Baethmann A, Kempfski O, 1992. Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 70 Suppl: S334-S343.
- Sekiguchi F, Mita Y, Kamanaka Y, Kawao N, Matsuya H, Taga C, Kawabata A, 2004. The potent inducible nitric oxide synthase inhibitor ONO-1714 inhibits neuronal NOS and exerts antinociception in rats. *Neurosci. Lett.* 365: 111-115.
- Seo HG, Takata I, Nakamura M, Tatsumi H, Suzuki K, Fujii J, Taniguchi N, 1995. Induction of nitric oxide synthase and concomitant suppression of superoxide dismutases in experimental colitis in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 324: 41-47.
- Serrano J, Encinas JM, Fernandez AP, Rodrigo J, Martinez A, 2006. Effects of acute hypobaric hypoxia on the nitric oxide system of the rat cerebral cortex: Protective role of nitric oxide inhibitors. *Neuroscience* 142: 799-808.
- Serrano J, Fernandez AP, Martinez-Murillo R, Alonso D, Rodrigo J, Salas E, Mourelle M, Martinez A, 2007. The nitric oxide donor LA 419 decreases ischemic brain damage. *Int. J. Mol. Med.* 19: 229-236.
- Sessa WC, 1994. The nitric oxide synthase family of proteins. *J. Vasc. Res.* 31: 131-143.
- Sessa WC, 2004. eNOS at a glance. *J. Cell Sci.* 117: 2427-2429.
- Shibuta S, Varathan S, Mashimo T, 2003. The neuroprotective effect of ONO-1714 on NMDA-mediated cytotoxicity in vitro. *J. Neurol. Sci.* 215: 31-36.
- Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, Graham DI, 1985. Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema. *J. Neurosurg.* 63: 272-277.
- Shiraishi K, Sharp FR, Simon RP, 1989. Sequential metabolic changes in rat brain following middle cerebral artery occlusion: a 2-deoxyglucose study. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 9: 765-773.
- Siesjö BK, 1994. Calcium-mediated processes in neuronal degeneration. *Ann N Y Acad Sci* 747: 140-161.
- Siesjö BK, Katsura K, Zhao Q, Folbergrova J, Pahlmark K, Siesjö P, Smith ML, 1995. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. *J. Neurotrauma* 12: 943-956.

Simeone TA, Sanchez RM, Rho JM, 2004. Molecular biology and ontogeny of glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *J. Child Neurol.* 19: 343-360.

Simmons ML, Murphy S, 1992. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. *J. Neurochem.* 59: 897-905.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR, 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1107-1112.

Small DL, Morley P, Buchan AM, 1999. Biology of ischemic cerebral cell death. *Prog. Cardiovasc. Dis* 42: 185-207.

Smith DF, Whitesell L, Nair SC, Chen S, Prapapanich V, Rimerman RA, 1995. Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol. Cell Biol.* 15: 6804-6812.

Sobrado M, Delgado M, Fernandez-Valle E, Garcia-Garcia L, Torres M, Sanchez-Prieto J, Vivancos J, Manzanares R, Moro MA, Pozo MA, Lizasoain I, 2011. Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroimage.* 57: 45-54.

Song Y, Zweier JL, Xia Y, 2001. Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca²⁺/calmodulin binding. *Biochem. J.* 355: 357-360.

Srivastava K, Bath PM, Bayraktutan U, 2012. Current therapeutic strategies to mitigate the eNOS dysfunction in ischaemic stroke. *Cell Mol. Neurobiol.* 32: 319-336.

Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID, 2010. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist.* 16: 435-452.

Sullivan W, Stensgard B, Caucutt G, Bartha B, McMahon N, Alnemri ES, Litwack G, Toft D, 1997. Nucleotides and two functional states of hsp90. *J. Biol. Chem.* 272: 8007-8012.

Svedin P, Hagberg H, Savman K, Zhu C, Mallard C, 2007. Matrix metalloproteinase-9 gene knock-out protects the immature brain after cerebral hypoxia-ischemia. *J. Neurosci.* 27: 1511-1518.

Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM, 2004. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr. Mol. Med.* 4: 193-205.

Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M, 2006. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* 9: 260-267.

Terasaki Y, Liu Y, Hayakawa K, Pham LD, Lo EH, Ji X, Arai K, 2014. Mechanisms of neurovascular dysfunction in acute ischemic brain. *Curr. Med. Chem.* 21: 2035-2042.

Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O, 2007. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38: 3032-3039.

Tomlins AM, Foxall PJ, Lynch MJ, Parkinson J, Everett JR, Nicholson JK, 1998. High resolution 1H NMR spectroscopic studies on dynamic biochemical processes in incubated human seminal fluid samples. *Biochim. Biophys. Acta* 1379: 367-380.

- Toth A, Kovacs K, Deres P, Halmosi R, Czopf L, Hanto K, Kalai T, Hideg K, Sumegi B, Toth K, 2003. Impact of a novel cardioprotective agent on the ischaemia-reperfusion-induced Akt kinase activation. *Biochem. Pharmacol.* 66: 2263-2272.
- Trotter J, Karram K, Nishiyama A, 2010. NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res. Rev.* 63: 72-82.
- Tsang TM, Griffin JL, Haselden J, Fish C, Holmes E, 2005. Metabolic characterization of distinct neuroanatomical regions in rats by magic angle spinning ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson. Med.* 53: 1018-1024.
- Tsujimoto Y, 2002. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci. Rep.* 22: 47-58.
- Tzeng TB, Fung HL, 1992. Pharmacodynamic modeling of the in vitro vasodilating effects of organic mononitrates. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 20: 227-251.
- Ueno Y, Chopp M, Zhang L, Buller B, Liu Z, Lehman NL, Liu XS, Zhang Y, Roberts C, Zhang ZG, 2012. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke.* 43: 2221-2228.
- Vaughan CJ, Delanty N, 1999. Neuroprotective properties of statins in cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 30: 1969-1973.
- Veltkamp R, Rajapakse N, Robins G, Puskar M, Shimizu K, Busija D, 2002. Transient focal ischemia increases endothelial nitric oxide synthase in cerebral blood vessels. *Stroke* 33: 2704-2710.
- Vilahur G, Segales E, Casani L, Badimon L, 2004. A novel anti-ischemic nitric oxide donor inhibits thrombosis without modifying haemodynamic parameters. *Thromb. Haemost.* 91: 1035-1043.
- Villacampa N, Almolda B, Gonzalez B, Castellano B, 2013. Tomato lectin histochemistry for microglial visualization. *Methods Mol. Biol.* 1041: 261-279.
- Vincent SR, 2010. Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Prog. Neurobiol.* 90: 246-255.
- Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LB, Tiwari-Woodruff S, Sofroniew MV, 2009. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J. Neurosci.* 29: 11511-11522.
- Wang HH, Hsieh HL, Yang CM, 2011. Nitric oxide production by endothelin-1 enhances astrocytic migration via the tyrosine nitration of matrix metalloproteinase-9. *J. Cell Physiol* 226: 2244-2256.
- Warner DS, Todd MM, Dexter F, Ludwig P, McAllister AM, 1995. Temporal thresholds for hyperglycemia-augmented ischemic brain damage in rats. *Stroke* 26: 655-660.
- Waters NJ, Holmes E, Williams A, Waterfield CJ, Farrant RD, Nicholson JK, 2001. NMR and pattern recognition studies on the time-related metabolic effects of alpha-naphthylisothiocyanate on liver, urine, and plasma in the rat: an integrative metabonomic approach. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 1401-1412.

Waxman SG, Davis PK, Black JA, Ransom BR, 1990. Anoxic injury of mammalian central white matter: decreased susceptibility in myelin-deficient optic nerve. *Ann. Neurol.* 28: 335-340.

Wei G, Dawson VL, Zweier JL, 1999. Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1455: 23-34.

Whittle BJ, 2002. ONO-1714 (Ono). *IDrugs.* 5: 590-593.

Willmot M, Gibson C, Gray L, Murphy S, Bath P, 2005a. Nitric oxide synthase inhibitors in experimental ischemic stroke and their effects on infarct size and cerebral blood flow: a systematic review. *Free Radic. Biol. Med.* 39: 412-425.

Willmot M, Gray L, Gibson C, Murphy S, Bath PM, 2005b. A systematic review of nitric oxide donors and L-arginine in experimental stroke; effects on infarct size and cerebral blood flow. *Nitric. Oxide.* 12: 141-149.

Willmot MR, Bath PM, 2003. The potential of nitric oxide therapeutics in stroke. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 12: 455-470.

Wind RA, Hu JZ, Rommereim DN, 2001. High-resolution (1)H NMR spectroscopy in organs and tissues using slow magic angle spinning. *Magn Reson. Med.* 46: 213-218.

Wolburg H, Lippoldt A, 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* 38: 323-337.

Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, Newcomb EW, 1998. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* 17: 1069-1078.

Wood PL, Choksi S, Bocchini V, 1994. Inducible microglial nitric oxide synthase: a large membrane pool. *Neuroreport* 5: 977-980.

Wright CD, Mulsch A, Busse R, Osswald H, 1989. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 813-819.

Xu W, Charles IG, Moncada S, Gorman P, Sheer D, Liu L, Emson P, 1994. Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (NOS2 and NOS3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively. *Genomics* 21: 419-422.

Xu W, Gorman P, Sheer D, Bates G, Kishimoto J, Lizhi L, Emson P, 1993. Regional localization of the gene coding for human brain nitric oxide synthase (NOS1) to 12q24.2-->24.31 by fluorescent in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 64: 62-63.

Yamashima T, 2004. Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 36: 285-293.

Yamashima T, Saido TC, Takita M, Miyazawa A, Yamano J, Miyakawa A, Nishijyo H, Yamashita J, Kawashima S, Ono T, Yoshioka T, 1996. Transient brain ischaemia provokes Ca²⁺, PIP₂ and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1932-1944.

Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez AP, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K, 2006.

Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J. Neurosci.* 26: 6627-6636.

Yang Y, Rosenberg GA, 2011. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke* 42: 3323-3328.

Yuba T, Nagata K, Yamada T, Osugi S, Kuwahara H, Iwasaki Y, Handa O, Naito Y, Fushiki S, Yoshikawa T, Marunaka Y, 2007. A novel potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ONO-1714, reduces hyperoxic lung injury in mice. *Respir. Med.* 101: 793-799.

Yun HY, Dawson VL, Dawson TM, 1997. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol. Psychiatry* 2: 300-310.

Zamzami N, Kroemer G, 2001. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 67-71.

Zhang F, Iadecola C, 1993. Nitroprusside improves blood flow and reduces brain damage after focal ischemia. *Neuroreport* 4: 559-562.

Zhang Q, Church JE, Jagnandan D, Catravas JD, Sessa WC, Fulton D, 2006. Functional relevance of Golgi- and plasma membrane-localized endothelial NO synthase in reconstituted endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 1015-1021.

Zhang R, Zhang L, Zhang Z, Wang Y, Lu M, Lapointe M, Chopp M, 2001. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann. Neurol.* 50: 602-611.

Zhang RL, LeTourneau Y, Gregg SR, Wang Y, Toh Y, Robin AM, Zhang ZG, Chopp M, 2007a. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J. Neurosci.* 27: 3157-3162.

Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Bredt D, Synder SH, Hokfelt T, 1993a. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J. Comp Neurol.* 335: 563-575.

Zhang Y, Park TS, Gidday JM, 2007b. Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 292: H2573-H2581.

Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, Pollock JS, Forstermann U, 1993b. Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24: 2016-2021.

Zhao Q, Zhang C, Wang X, Chen L, Ji H, Zhang Y, 2012a. (S)-ZJM-289, a nitric oxide-releasing derivative of 3-n-butylphthalide, protects against ischemic neuronal injury by attenuating mitochondrial dysfunction and associated cell death. *Neurochem. Int.* 60: 134-144.

Zhao Q, Zhang C, Wang X, Chen L, Ji H, Zhang Y, 2012b. (S)-ZJM-289, a nitric oxide-releasing derivative of 3-n-butylphthalide, protects against ischemic neuronal injury by attenuating mitochondrial dysfunction and associated cell death. *Neurochem. Int.* 60: 134-144.

Zhou L, Zhu DY, 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20: 223-230.

BIBLIOGRAFÍA

Zhou L, Zhu DY, 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*. 20: 223-230.

Zhu L, Gunn C, Beckman JS, 1992. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 452-457.

Zulch KJ, 1985. *The Cerebral Infarct. Pathology, Pathogenesis, and Computed Tomography*. Springer-Verlag.

9. ANEXO

